



生物化学实验技术丛书

离心沉降分析技术

陶宗晋 编著

科学出版社

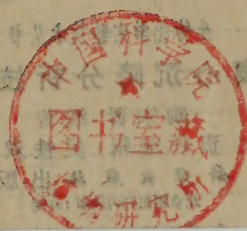
58.173057
474

生物化学实验技术丛书

介 简 容 内

离心沉降分析技术

陶宗晋 编著



中科院植物所图书馆



S0011848

科学出版社

1983.3

23491

内 容 简 介

超离心沉降分析是一门测定生物高分子分子量和物理性质的技术。本书着重于叙述这项技术的具体实验操作方法,对沉降分析理论背景只作简略的说明。除概述了沉降分析实验的一般考虑和注意之点外,还着重介绍了与实验设计直接有关的分析超离心机各部件。书中阐述的各种测定方法都举例详细地说明实验条件和数据计算方法。在最后的附录中扼要地叙述了制备超离心技术的原理和方法,以及选择实验条件的依据,为制备超离心沉降实验设计提供了方便。

本书可供生物化学、生物物理工作者以及有关大学的教师、研究生、大学生参考。

生物化学实验技术丛书

离心沉降分析技术

陶宗晋 编著

责任编辑 吴铁双

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1983 年 10 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

1983 年 10 月第一次印刷 印张: 6 1/4

印数: 0001—4,150 字数: 142,000

统一书号: 13031·2394

本社书号: 3272·13—10

定价: 1.00 元

目 录

第一章 引言	1
第二章 超离心分析技术概述	2
第三章 仪器	7
一、分析超离心机	7
二、分析转头	7
三、分析离心池	8
四、光学检测方法	11
第四章 实验的一般考虑和注意	16
一、样品制备	16
二、离心机的使用及转头、离心池的选择	16
三、光学系统的选择	17
四、沉降图谱的分析	18
五、离心分析实验应考虑的现象	23
第五章 沉降速度的测定	28
一、移动界面法测定沉降系数	28
二、特殊情况沉降系数的测定	34
三、样品均一性的鉴定和不均一性的分析	36
四、区带沉降法	38
五、沉降系数和分子量	39
六、从沉降系数计算 DNA 分子量	39
第六章 沉降-扩散法测定分子量	43
一、沉降-扩散法原理	43
二、离心池中测定扩散系数	44
第七章 沉降平衡法	47
一、低速沉降平衡法测定分子量	47
二、高速沉降平衡法测定分子量	59
三、短液柱沉降平衡法(中点法)测定分子量	66
四、有关用特殊溶剂做的实验	68
第八章 Archibald 方法	69
第九章 密度梯度平衡法测定分子量	72
第十章 离心分析技术必须的辅助测定	79
一、密度	79
二、粘度	81
三、偏微比容	82

附录 制备超离心技术.....	86
-----------------	----

一、分级离心法.....	86
--------------	----

二、密度梯度离心法.....	86
----------------	----

三、密度梯度分离法的实验方法.....	89
---------------------	----

四、实验设计的一些参考.....	93
------------------	----

参考文献.....	96
-----------	----

1	生野米赴时谷心离疏	章二第
2	器刀	章三第
3	离心离疏	一
4	离心离疏	二
5	离心离疏	三
6	离心离疏	四
7	离心离疏	五
8	离心离疏	六
9	离心离疏	七
10	离心离疏	八
11	离心离疏	九
12	离心离疏	十
13	离心离疏	十一
14	离心离疏	十二
15	离心离疏	十三
16	离心离疏	十四
17	离心离疏	十五
18	离心离疏	十六
19	离心离疏	十七
20	离心离疏	十八
21	离心离疏	十九
22	离心离疏	二十
23	离心离疏	二十一
24	离心离疏	二十二
25	离心离疏	二十三
26	离心离疏	二十四
27	离心离疏	二十五
28	离心离疏	二十六
29	离心离疏	二十七
30	离心离疏	二十八
31	离心离疏	二十九
32	离心离疏	三十
33	离心离疏	三十一
34	离心离疏	三十二
35	离心离疏	三十三
36	离心离疏	三十四
37	离心离疏	三十五
38	离心离疏	三十六
39	离心离疏	三十七
40	离心离疏	三十八
41	离心离疏	三十九
42	离心离疏	四十
43	离心离疏	四十一
44	离心离疏	四十二
45	离心离疏	四十三
46	离心离疏	四十四
47	离心离疏	四十五
48	离心离疏	四十六
49	离心离疏	四十七
50	离心离疏	四十八
51	离心离疏	四十九
52	离心离疏	五十
53	离心离疏	五十一
54	离心离疏	五十二
55	离心离疏	五十三
56	离心离疏	五十四
57	离心离疏	五十五
58	离心离疏	五十六
59	离心离疏	五十七
60	离心离疏	五十八
61	离心离疏	五十九
62	离心离疏	六十
63	离心离疏	六十一
64	离心离疏	六十二
65	离心离疏	六十三
66	离心离疏	六十四
67	离心离疏	六十五
68	离心离疏	六十六
69	离心离疏	六十七
70	离心离疏	六十八
71	离心离疏	六十九
72	离心离疏	七十
73	离心离疏	七十一
74	离心离疏	七十二
75	离心离疏	七十三
76	离心离疏	七十四
77	离心离疏	七十五
78	离心离疏	七十六
79	离心离疏	七十七
80	离心离疏	七十八
81	离心离疏	七十九
82	离心离疏	八十
83	离心离疏	八十一
84	离心离疏	八十二
85	离心离疏	八十三
86	离心离疏	八十四
87	离心离疏	八十五
88	离心离疏	八十六
89	离心离疏	八十七
90	离心离疏	八十八
91	离心离疏	八十九
92	离心离疏	九十
93	离心离疏	九十一
94	离心离疏	九十二
95	离心离疏	九十三
96	离心离疏	九十四
97	离心离疏	九十五
98	离心离疏	九十六
99	离心离疏	九十七
100	离心离疏	九十八
101	离心离疏	九十九
102	离心离疏	一百

第一章 引言

1924年 Svedberg 和 Rinde^[1] 首先设计制造了超(速)离心机,实现了在强大离心力作用下沉降微小颗粒。他们开始设计的目的是研究金属胶体粒子,但是很快发现这是研究高分子化合物的重要工具。用超离心机研究的第一个高分子化合物是蛋白质。1926年 Svedberg 和 Fåhræus^[2] 测定了马血红蛋白的分子量,为 68,000。以后不断地对各种蛋白质进行分子量测定,结果得到重复的高分子量,因此证实了蛋白质确实是一个真正的高分子化合物,而不是一些低分子单元的任意排列或聚合。

以后超离心机有了改进,特别是五十年代市上出售的商品超离心机,性能有了很大提高,与此同时发展了各种超离心分析技术。现在超离心机几乎已成为实验室,尤其是蛋白质研究实验室不可缺少的重要工具。

超离心沉降分析作为一种研究手段,它具有许多优点。例如可在低温下进行测定;并且相当快速,这就比较适宜研究娇嫩的和不稳定产物的纯度和均匀度。另一优点是样品需要量很少。离心池的容量不到一毫升,还可采用浓度较稀的样品,从而避免了对溶液的非理想性作校正。用折射率方法检测时约需一毫克样品,而用光吸收法检测时,消光系数大的样品检测极限在微克水平。

从超离心沉降实验结果很容易计算沉降系数 S 、分子量 M 、扩散系数 D 和沉降物质的浓度。同时也可观察到溶液中是否存在几种不同的组分,还可以研究沉降物质的不均一性。

超离心沉降分析最重要的应用当然是分子量测定。值得指出的是,现在超离心沉降分析测定的分子量范围已从数百直至几百万,仅有百分之几的误差。研究多组分体系或不均一物质时,视样品的性质可以有相当高的精确度。对一个典型蛋白质来讲,如果含有百分之几杂质并且杂质的大小相当于该蛋白质分子大小的一半左右,则一般要检出这个杂质是不困难的。由于存在 Johnston-Ogston 效应,检出和蛋白质相对来讲分子量较小的杂质是容易的。对于分子量广泛分布的样品,虽然结果处理有些困难,但是把沉降曲线经过一系列数学分析,得到相当满意的关于非均一度的信息。

现在超离心分析技术已能够测定样品之间非常小的密度差和沉降系数差 ($0.005S$)。

和已知的典型流体力学模型——如椭球等的相应有关数据比较, S 、 M 和 D 的值可以提供样品分子大小和形状的信息。通常所得结果是半定量的,并且需要知道不同模型的大量参数才能区别。为此,应该和其他由分子形状决定的物理量,如粘度、光散射、流动双折射等进行比较。通过这种方法可以发现非常小的流体力学行为上的差别。不过和不同的分子形状联系常常是很困难的。

沉降平衡离心可以得到热力学数据,因此,这个方法也是详细研究高分子溶液性质的一个有力工具。

在这里要全面概括目前超离心技术所能解决的问题显然是不现实的。早期超离心沉降分析所做的工作(1940年以前) Svedberg 和 Pederson^[3] 已作了全面总结。在此以后也曾有过很好的综述和评论^[4,5]。本书仅就超离心技术最基本的实验方法作一介绍,读者如需进一步了解超离心沉降分析技术,请参阅有关著作。

第二章 超离心分析技术概述

当一个悬浊液放置时,由于重力场的作用,可以看到悬浮的粒子逐渐沉降。从沉降的速度可以计算悬浮粒子的质量。高分子溶液里的分散质点(高分子)的质量很小,所以要用超离心机,在很大的离心力场里才能观察到它们的沉降。超离心机的转速可以达到每秒 1000 转以上,产生几十万倍于重力的离心力。

在分析超离心机中进行沉降分析,利用超离心机高速运转产生的强大离心力,用光学检测装置检测溶液中溶质的移动速度;或者在较低转速使高分子溶质在较小离心力场内沉降(产生浓度梯度)和扩散(减小浓度梯度),这两种相反的作用经过一段时间达到平衡,测量溶质在离心池中的分布。在超离心沉降分析技术中,前者称为沉降速率法,后者称为沉降平衡法。

分析超离心机的标准离心池如图 2-1 所示。盛放溶液的槽是四棱柱,柱的端面呈扇形。离心池放入分析转头(图 2-2)的孔中,扇形的尖顶正对着旋转中心,这样可以避免旋转时离心池内溶液对流。离心池上下分别安装一块石英窗(图 2-1W),允许光线通过,运转过程中可以利用光学方法检测。转头旋转产生离心力,样品溶液中溶质比重大于溶剂时,溶质从液面沿着旋转半径向转头边缘沉降下去。反之,若溶质轻于溶剂,则出现溶质“上浮”现象。离心池内溶液槽扇形狭的一边叫池顶,另一边叫池底。转头上距旋转轴的距离以 r 表示,液面的位置是 r_m ,液底的位置是 r_b 。因此溶液的液柱高 $h = r_b - r_m$ 。离心池的厚度 l 是指离心池溶液槽棱柱的高度,也就是两片石英窗之间的距离。

超离心沉降分析的分辨能力正比于液柱高度 h 和离心力 $\omega^2 r$, 其中 ω 是角速度。从

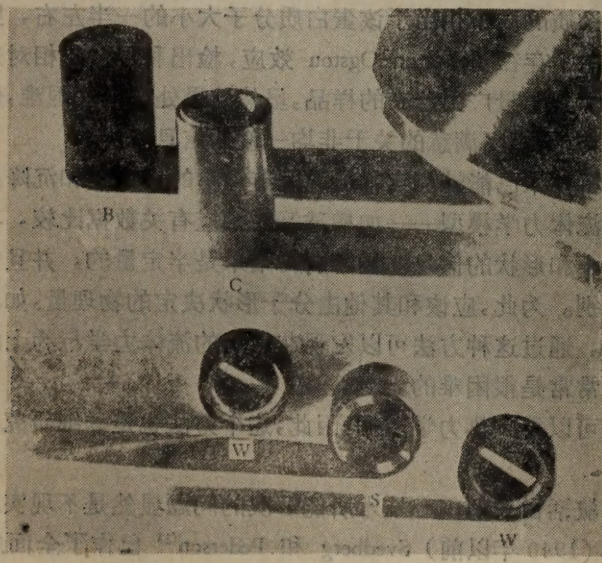


图 2-1 分析离心池。C—外形; B—抗重离心池; W—石英窗; S—池芯,中有一四棱柱液槽。

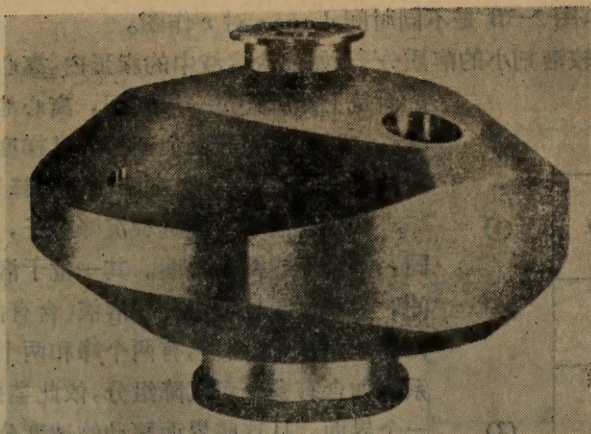


图 2-2 分析转头

实验和理论的角度来考虑, r 约为 7cm 和 h 约为 2cm 最为合适^[3]。

离心过程中离心池内样品溶液浓度(c)的变化用光学方法跟踪, 或者测定溶液的折射率(n), 或者测定溶液的光吸收值。用 Schlieren 光学方法得到的是折射率梯度(dn/dr)对距轴心距离(r)的曲线(图 2-3B)。干涉光方法得到的是折射率(n)作为距轴心距离(r)的函数(图 2-3A)。在通常实验样品浓度范围内折射率和浓度成正比, 因此得到的曲线图分别对应于 dc/dr 、 r 或 c 、 r , 其中 c 是浓度。用光吸收法检测时, 光密度和浓度成正比, 得到的是(c , r)类型的曲线(图 2-3A)。

目前使用的分析超离心机几乎都是现成定型的产品, 比较容易操纵, 相对来讲运转费用也比较低。

沉降速率法实验时, 超离心机内转头以高速运转, 如果溶液中只有一种溶质组分在离心力作用下沉降, 可以观察到原先在离心池中均匀分布的溶质分子以一定速度向转头边缘移去, 经过一定时间离心池中形成一个纯溶剂的区域和一个浓度均一的区域(图 2-3A)。这个浓度均一区域称为坪区。坪区和溶剂区之间出现一个界面, 通常界面是很陡峭的, 这是因为界面后半部由扩散而尾随的溶质分子是在较低的浓度中沉降, 具有较高的沉降速度, 从而赶上前面的分子。坪区浓度随界面外移而连续地逐步变稀, 这是因为离心池中溶液槽的端面是扇形, 溶液不断稀释, 浓度减小。从界面移动速度可以计算沉降系数。沉降系数和沉降粒子的大小和形状有关。沉降系数结合另外一些独立测定的数据可以计算沉降分子的分子量。图 2-3 是沉降速率法示意图, 图 2-3A 是不

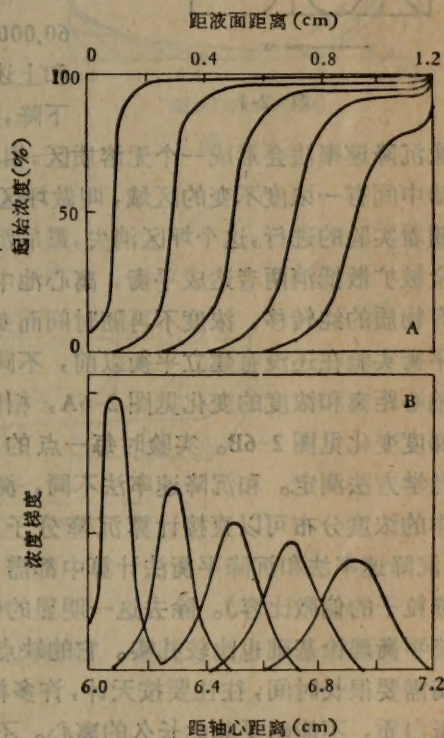


图 2-3 沉降速率法实验时, 浓度(A)和浓度梯度(B)与离心池距离的函数关系示意图。

同时时间 c 对 r 作图,图 2-3B 是不同时间 dc/dr 对 r 作图。

至于那些比重较溶剂小的溶质分子,如浓盐溶液中的脂蛋白,离心过程中溶质不是下沉而是上浮。经过一段时间,离心池底部形成一纯溶剂区,这时沉降系数是负值。浓度梯度(也即折射率梯度)跨越界面时也是负值,沉降图谱上峰形是倒的。

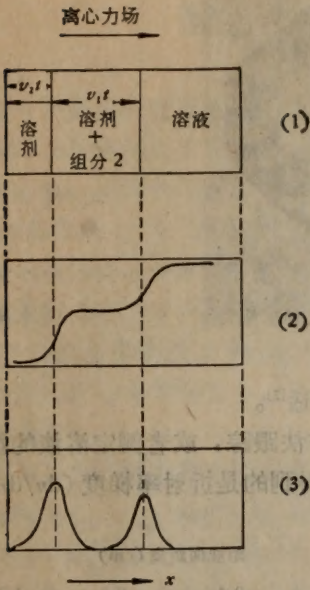


图 2-4

如果溶液中存在两种沉降分子,它们的沉降系数不同,则会形成两个界面。其一位于溶剂和较慢移动组分间,另一位于较慢组分和溶液(含有两种组分)间。结果得到如图2-4的图形,有两个峰和两个阶梯。一个待分析系统如含有多个可沉降组分,依此类推,每一新组分产生一个界面,从这些界面移动的速度分别计算各个组分的沉降系数。

如果系统中包含有一大批不同的分子,它们不同的沉降系数在界面上形成连续的分布,可以计算沉降系数的分布函数,当然也可以计算分子量的分布函数。

溶液在相对较低转速时离心沉降[譬如说分子量为60,000的蛋白质在8,000rpm(转/分)离心],这时的情况和上述沉降速率法很不一样。离心开始阶段液面处浓度下降,离心池底部浓度增高。由于扩散作用,离心池内不

像沉降速率法会形成一个无溶质区,相反液面处始终存在溶质,即使浓度是很低的。离心池中间有一浓度不变的区域,叫做坪区(图2-5)。

随着实验的进行,这个坪区消失,最后沉降速度完全被扩散抵消两者达成平衡,离心池中没有任何物质的纯转移,浓度不再随时间而变化。沉降平衡实验在还没有建立平衡以前,不同时间的距轴心距离和浓度的变化见图2-6A,相应的浓度梯度变化见图2-6B。实验时每一点的浓度利用光学方法测定。和沉降速率法不同,测定离心池中的浓度分布可以直接计算沉降分子的分子量(沉降速率法和沉降平衡法计算中都需要知道沉降粒子的偏微比容)。除去这一明显的优点外,沉降平衡理论基础也比较扎实。它的缺点是达到平衡需要很长时间,往往要按天计,许多样品,例如

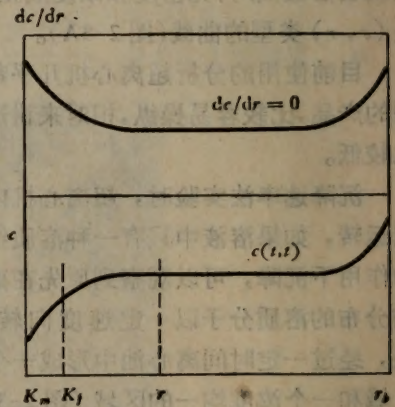


图 2-5 沉降平衡离心图。此图中坪区依然存在,表示尚未到达平衡。

蛋白质,不能耐受如此长久的离心。不过目前超离心机已经能够使转头在低温下长时期运转,并且从理论上证明,在实验操作上予以变通可以大大缩短达到平衡所需的时间。

另一种不同的方法,即等密度梯度沉降法,是让溶质在一密度梯度介质中沉降,直至周围介质的密度和溶质密度相等时为止。从溶质停留在离心池中的位置来计算分子量。

总之,几种超离心分析技术的区别主要是从操作的观点着眼,很难清楚地说明它们之间的截然不同界限。事实上有可能仔细选择实验条件,从一个实验的数据按照这些技术

不同的要求进行处理。不同的超离心分析技术可以进一步用热力学方程式统一起来。

几乎所有超离心分析技术实验的数学基础是 Lamm 导出的微分方程^[4]。试考虑旋转的扇形离心池中一个单位四棱柱体积 (图 2-7)，它的两个面分别距轴心 r 和 $r + dr$ 。一个面上通过的沉降粒子数量 $J_s(r, t)$ 取决于该面上的溶液浓度 c 、面积、粒子沉降速度。由于沉降速度可以用单位离心力场沉降速度 (即沉降系数 S) 和离心力 $\omega^2 r$ 的乘积来表示, 因此

$$J_s(r, t) = c \phi r l s \omega^2 r \quad (2-1)$$

其中 ϕ 是扇形的角度, 以弧度表示; l 是光径, 即离心池溶液槽棱柱的高度; r 是距轴心的距离; $\phi r l$ 是柱面积; ω 是离心池的角速度 (弧度/秒), S 是沉降系数

$$S \equiv \frac{dr/dt}{\omega^2 r} \quad (2-2)$$

其中 t 是时间。沉降系数 S 单位的因次是 cm/秒/达因/克, 现在定为 Svedberg (S)。1S = 10^{-13} 秒。

由于存在扩散作用, 粒子也有反向流动。根据 Fick 第一定律, 向轴心运动的粒子数量 $J_D(r, t)$

$$J_D(r, t) = -D \phi r l \frac{\partial c}{\partial r} \quad (2-3)$$

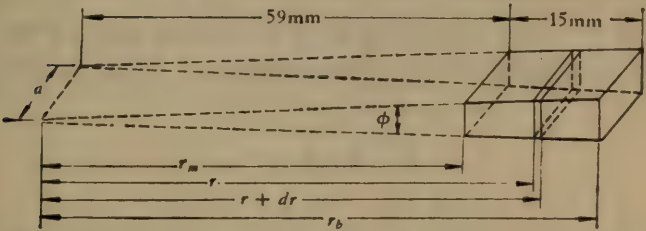


图 2-7

其中 D 是扩散系数, $\frac{\partial c}{\partial r}$ 是距轴心 r 处一个面的浓度梯度。因此在此 r 面上沉降粒子的净转移数量 $J(r, t)$ 为上述两项之和

$$J(r, t) = J_s(r, t) + J_D(r, t) = \phi r l \left[c s \omega^2 r - D \frac{\partial c}{\partial r} \right] \quad (2-4)$$

过 $r + dr$ 面的粒子转移数量也可写成类似的式子。在 dt 时间内, r 和 $r + dr$ 之间增加粒子的数量是

$$[J(r, t) - J(r + dr, t)] dt = - \frac{\partial J(r, t)}{\partial r} dr dt \quad (2-5)$$

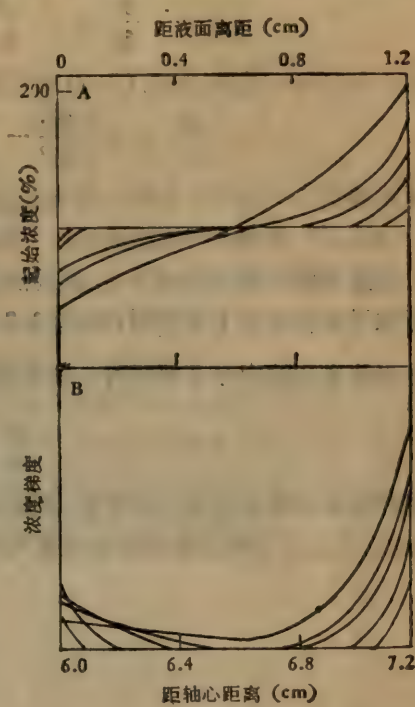


图 2-6

这相等于相应的浓度增加 $(\partial c / \partial t) dt$ 乘以体积 $\phi r l dr$, 因此

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[\left(D \frac{\partial c}{\partial r} - c s \omega^2 r \right) r \right] \quad (2-6)$$

假定 s 和 D 与 r 无关, 则式 (2-6) 可写成

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left[\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} - \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right] - s \omega^2 \left[r \frac{\partial c}{\partial r} + 2c \right] \quad (2-7)$$

必须强调式 2-7 仅限于 D 和 S 均与浓度无关的系统。实际上许多系统并不符合这个假设。Fujita^[5] 曾对 S 与浓度成线性关系的系统作了详细的讨论。

在这里所以要推导式 2-7, 因为这是超离心分析技术的基础。例如沉降速率法, 液面附近粒子浓度基本上等于零, 将式 (2-7) 解微分方程说明了所形成界面的性状。又例如沉降速率法离心池中存在坪区时, 该处 $\partial c / \partial r = 0$, $\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} = 0$, 代入式 (2-7), 得

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -2s\omega^2 c \quad (2-8)$$

说明坪区浓度随实验进行而降低。沉降平衡实验时, $\partial c / \partial t = 0$, 代入式 (2-7) 得到 Svedberg 方程式, 反应了沉降系数和扩散系数与分子量的关系。

第三章 仪 器

一、分析超离心机

超离心机和普通离心机的差别是超离心机的转速高得多。超离心机分为分析超离心机和制备超离心机,前者能精确控制离心力,并且用照相方法或者电子技术记录沉降粒子在离心过程中的行为。对这些记录进行分析可以测定粒子的物理性质。

虽然 1924 年开始出现了超离心分析技术,但是直到五十年代电动超离心机成为商品出售以后,才促使超离心分析技术迅速发展。有意思的是,尽管分析超离心机外形、驱动部件、控制部件等有所不同,但是和离心分析实验直接有关的部件,如转头、离心池等的基本设计更动极少,甚至如离心池中心至轴心的距离(65.0mm)也保持不变。

分析超离心机应该具有下列功能:

- (1) 高速旋转;
- (2) 速度的选择和控制;
- (3) 温度的选择和控制;
- (4) 离心过程中检测(光学摄影或扫描)。

现在世界上各实验室装备的分析超离心机大多数是美国 Beckman 公司出品的 Spinco E 型分析超离心机。它用电动机经齿轮变速带动转头旋转。新的机型最高转速为 80,000 rpm,但是由于离心池上透光材料石英窗强度的限制,实际上只用到 60,000rpm (宝石窗离心池为 68,000rpm);平均转速恒定在 $\pm 0.15\%$ 以内。温度维持在 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 内,读数精确至 0.02°C 。机内装有光学系统和自动摄影,摄影间隔自 2 分至 12 小时 48 分。

分析超离心机的结构和操作具体部分因机而异,请参阅有关仪器的说明书。

二、分析转头

分析超离心机的分析转头如图 3-1 所示。转头所用材料的强度仍是限制离心力的决定因素之一。现在主要用铝合金或钛合金来制造转头。分析转头有双孔、四孔、六孔之分,分别可放入相应数量的离心池。最高转速较高的转头外形铸成卵形,以免应力集中于



图 3-1 分析转头

表 3-1 Beckman Spinco E 型分析离心机中使用的各种分析转头的特性

型 号	最高转速 (rpm)	离心池中心 最大离心力 (g)	同时可放离 心池数量	主 要 用 途	
双孔				基本转头 最高转速转头,小分子测定,高温测定 稀浓度样品	} 沉降速率法, 沉降平衡法常 规使用
An-D	60,000	261,000	2		
An-H	68,000	336,000	2		
An-E	52,000	196,500	2		
四孔				最高转速多孔转头 基本低速转头	} 同时测定多个 样品
An-F	52,000	196,500	4		
An-F, Ti	60,000	261,000	4		
An-K	44,000	140,600	4		
An-J	18,000	23,500	4		
六孔				干涉光学系统平衡实验	
An-G	40,000	116,300	5		
AnG, Ti	48,000	170,000	5		

两孔处。根据不同的实验目的设计了各种转头,它们的特性和用途见表 3-1。

三、分析离心池

分析离心池的结构见图 3-2。 各种分析离心池的差别主要在盛放样品溶液的池芯。

螺丝圈

表 3-2 池芯的性能

上池窗座

材 料

铝 合 金

充填环氧树脂

Kel-F

pH 使用范围

pH7

pH3—10

全 pH 值

池窗

化学性能

不能用于腐蚀性溶液(强酸,强碱,重金属盐溶液,如铁、铜、铅、银、汞等)

在下列试剂中溶胀或溶解: 冰乙酸, 氢氧化铵 (27%), 三氯甲烷, 乙二胺, 二甲亚砜, 四氢呋喃, 二乙基三胺, 甲醛 (40%), m-甲酚, N, N-二甲基甲酰胺, 硝酸 (10%), 磷酸(85%), 硫酸 (70%)

下列溶剂中略为肿胀, 不能长时间使用: 氯, 二乙胺, 甲基或乙基乙酸乙酯, 甲基或乙基醚, 甲基或乙基丙烯酸, Freon 113, 呋喃, 三氯乙烯

池芯

池窗

对有机溶剂抗性强, 机械性能好。

对酸, 碱抗性强机械性能弱

下池窗座

最高转速

单槽: 转头最高转速; 双槽: 转头最高转速

单槽: 转头最高转速
双槽: 50,000rpm

单槽: 转头最高转速; 双槽: 60,000 rpm

池壳

最高操作温度

125℃

40℃

40℃

图 3-2 分析离心池

池芯两端分别由置于窗座中的“窗”封闭。池芯,“窗”、“窗座”等装在池壳内,将螺丝圈拧紧后放入转头的孔中。

分析离心池的池芯由不同的材料制造，设计成不同的形式以满足不同的实验目的和要求。制作池芯的材料有铝合金、铝粉或碳粉填充的环氧树脂或三氟氯乙烯树脂 (K₂F)，此外也有用聚酰胺的。各种材料池芯的性能见表 3-2。在实验中根据允许使用的最高转速、化学稳定性(不为溶剂溶解或腐蚀)、样品的浓度等来选择合适的池芯。一般分析用树脂池芯，高温测定或特种溶剂时用铝合金或铝粉充填树脂池芯。

各种不同的分析离心池芯的构造和用途分述于下：

(一) 单槽池

适用于一般沉降实验。池芯形状见图 3-3。池芯中有一扇形端面四棱柱槽。扇形角度有 2° 和 4° 两种。扇形角度愈小，离心池放入转头时愈要小心，务使针对轴心。此外还要增加摄影时曝光时间，不过需要的样品数量少并且界面、液面更近似直线。池芯厚度最小 1.5mm，最大 30mm，以厚 12mm 者最为常用。池芯的厚度和样品的浓度两者的乘积决定 Schlieren 光学系统所得图象内峰的面积或者干涉光学系统所得图象的干涉条纹的位移。例如用 30mm 厚池芯时，Schlieren 光学系统所得图象内峰的面积，较用 12mm 厚池芯时大 2.5 倍。因此选择不同厚度的池芯和样品溶液浓度组合，将允许有一相当大的样品浓度测定范围。

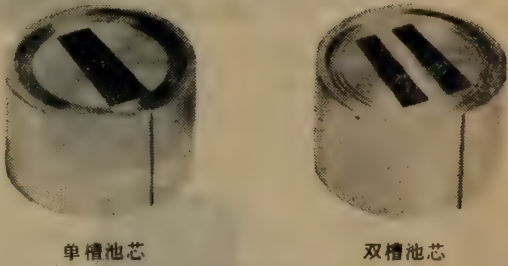


图 3-3 池芯

(二) 双槽池

用于沉降速率法、沉降平衡法测定。池芯的形状见图 3-3。池芯上有两个扇形端面四棱柱槽，扇形角度均为 2.5°。通常一槽置溶剂，另一槽置溶液。用双槽池得到的 Schlieren 图形中峰的下面有基线，可以校正由于离心池变形、介质中盐类化合物或其他物质部分沉降引起的浓度梯度。干涉光学系统或光电扫描系统检测必须用双槽池。池芯厚度有

表 3-3 双槽池 (12mm 厚池芯, 2.5°) 每一槽的容量

至轴心距离 (cm)	液柱高度 (cm)	容量 (ml)
6.20	1.00	0.35
6.30	0.90	0.32
6.40	0.80	0.29
6.50	0.70	0.25
6.60	0.60	0.22
6.70	0.50	0.18
6.80	0.40	0.15
6.90	0.30	0.11
7.00	0.20	0.07
7.10	0.10	0.04
7.20	0 (底)	0

12mm、18mm 和 30mm 三种。表 3-3 是 12mm 厚池芯双槽离心池 (2.5°) 每一槽中不同高度液体的容积。

(三) 合成界面离心池

分单槽(阀型、毛细管型)和双槽(毛细管型)三种(图 3-4)。在离心开始后,借助于离



图 3-4 池芯

心力溶剂流向溶液表面(或者溶液流向溶剂的底部)人为地合成一个界面。合成界面离心池可用来测定样品的起始浓度或者界面移动非常慢,甚至在常规操作下不能形成界面的物质,例如蔗糖的沉降系数。

(四) 多槽离心池

因为沉降平衡时间和溶液液柱高度成反比,实验常常采用短液柱来做,这就使池芯上有足够地方挖几个槽,同时进行几个样品的沉降平衡分析,节约了时间、费用,并且条件一致便于比较。一种六槽池芯见图 3-4。

(五) 机械分离离心池

它的池芯装有隔离片,分固定隔离片和移动隔离片两种(图 3-5),用于分离样品中两个不同的沉降组分。配合某种专一的分析方法,例如酶分析,可以在极粗的制剂中测定该酶的沉降速度。

(六) 区带沉降离心池

离心过程中密度较小的样品溶液借助于离心力铺在密度较大的溶液液面上,形成一薄层。样品以区带形式沉降。有三种形状的池芯(图 3-5)。专用于分析有紫外吸收的巨大高分子样品,如脱氧核糖核酸 (DNA)。



图 3-5 池芯

分析离心池池窗的材料有两种：石英和兰宝石(天然氧化铝)，常用的是石英。高速运转时 ($> 40,000\text{rpm}$)，使用干涉光学系统或光电扫描装置检测时应该用兰宝石窗的离心池。池窗的两个面是平行的，也有磨成一面倾斜、成楔形的。使用楔形窗的主要目的是运转一次可同时分析两个或两个以上样品，但是精度较差，有时也用于补偿密度梯度介质引起的光偏折。

为了使旋转时转头平衡，分析离心池装入转头后在转头另一侧与分析离心池对称的孔中还要放入抗重离心池。抗重离心池不仅平衡分析离心池的重量，也作为光学检测装置所得图象计算离心池中距轴心距离的基准。有两种类型的抗重离心池：一种用于 Schlieren 光学系统和光吸收法检测装置，另一种用于干涉光学系统和光电扫描检测装置。后者也可用于 Schlieren 光学系统。

四、光学检测方法

分析超离心机主要装备有三种光学系统，用来检测离心过程中离心池中样品的浓度及其变化。它们是 Schlieren 法、Rayleigh 干涉光法和光吸收法。前两种方法检测原理基于溶质和介质对光线有不同的折射这一性质，第三种方法是基于溶液的消光性质。根据记录方法又可分为摄影法和光电扫描法两种。

(一) Schlieren 光学系统

Schlieren 光学系统的检测原理是基于十九世纪法国物理学家 J. Foucault 发现的光学效应。Schlieren 是一个德文单词，其含义是条纹与阴影。超离心机上安装的主要是 Philpot 和 Svensson 设计的光学系统^[6-8]，用摄影方法记录由界面产生的光偏折。Schlieren 光学系统的基本装置由下列部件组成：光源，两个 Schlieren 透镜：准直镜和聚焦镜，一个光阑和成像屏(照相底片)。其中光阑可以是一根杆子、一条狭缝或相差片。Schlieren

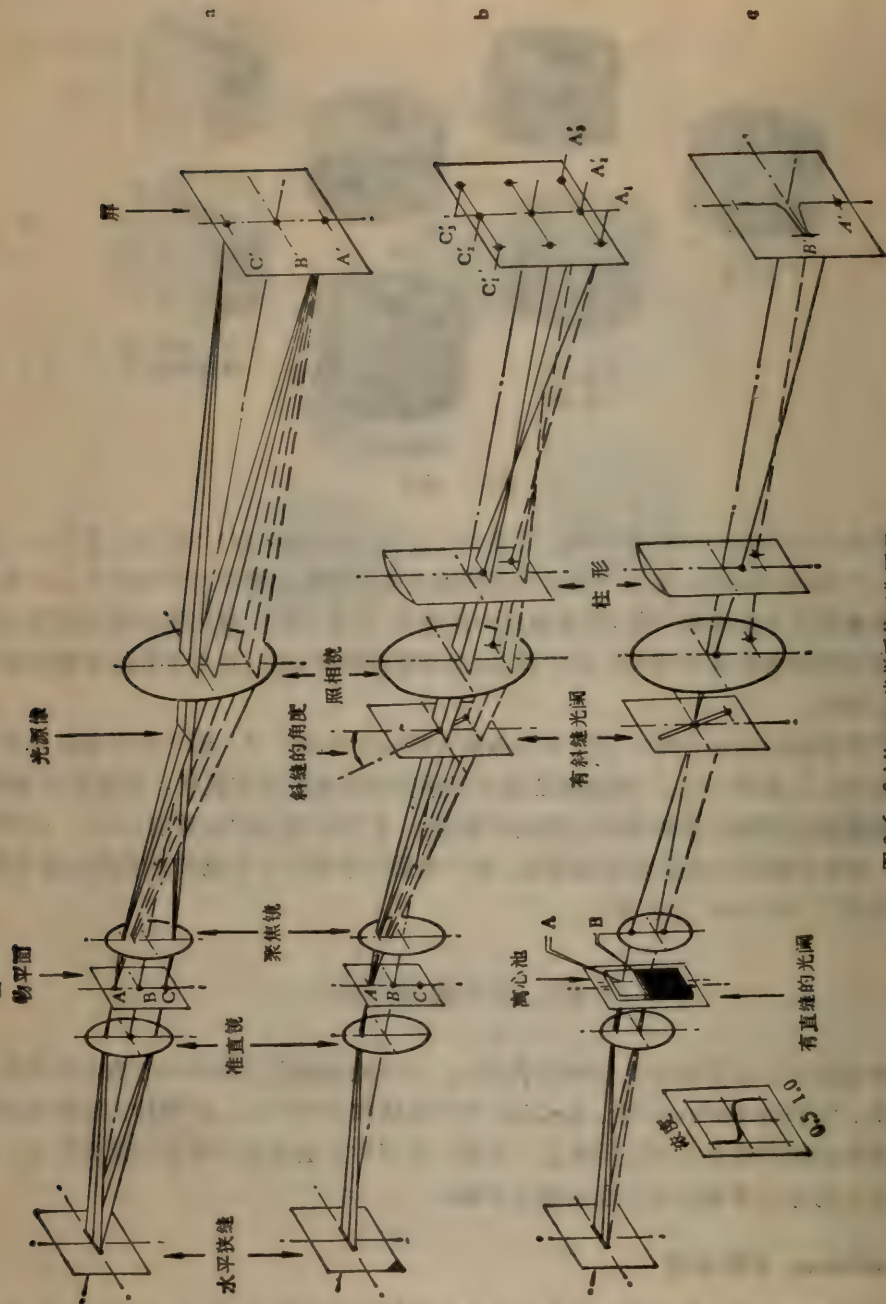


图 3-6 Schlieren 光学系统工作原理

光学系统的排列见图 3-6, 它的工作原理简述于下。在图 3-6a 上光源狭缝中任一点射出的光通过准直镜后平行, 聚焦镜又把光线聚焦, 成像于照相镜之前。通过光阑上小孔 (A, B, C) 的光线, 在照相镜的屏上成清晰的图像 (A' , B' , C')。同理, 经过狭缝的光线仍和光源狭缝平行。如果经过 A 点光线散射, 例如用稜镜使之向下偏折 (如折线所示), 仍会会聚于原处 A' , 因为透镜的设计已考虑这一情况。经过其他点的光线也已作同样考虑。在图 3-6b 中加进了一垂直光轴的柱形镜。这个透镜的作用是使光线提前会聚, 因而再度发散, 在屏上形成一直线像 A'_1 , A'_2 , A'_3 , 而不是一点像。它的位置使垂直方向的像在屏上依然聚焦很好。像的垂直位置不为柱形镜改变, 向下偏折的 A 线 (折线) 也不会改变线像的位置。现在在垂直平面上插入一带有斜狭缝的光阑, 斜狭缝的中心在光轴上。因此通过 A 没有偏折的光, 只有在中心线 (粗黑线) 可以通过后面的透镜到达屏上, 这时它的位置是 A'_2 , 和原先水平线 A' , B' , C' 不同。不偏折的光线通过 A、B 和 C 会聚成一像 (在第二光阑处), 它们也能出现在屏上。透过物体的光没有偏折时, B'_2 和 C'_2 沿着垂直轴前进。如果从 A 出发的光线向下偏折离开原先位置 (折射), 那末只有和光阑斜狭缝相交的那一点光线 (粗折线) 可通过后面的透镜, 与 A 相应的像将在屏上 A'_1 处出现。这点和中心线 A'_2 , C'_2 的水平距离与光线在物体中的偏折成正比。从 B 和 C 来的光线无影响。因而这个系统可以使一个垂直偏折的光转换成光线在屏上 (或底片上) 水平的位移, 却不改变光点的垂直高度, 而这垂直高度本身相应于物体一定位置 (像图上所示垂直孔的位置)。

按照上述安排, 用一水平狭缝代替孔 A、B 和 C 可增加光强度和屏上的分辨率。每一光点 A、B 和 C 由一光平面代替。任一与此狭缝相应的光线通过斜缝的光更多, 发散后走向照相镜, 然而在屏上聚焦。因为柱形镜已被安排产生这个效应。现在假定如图 3-7c 的情况, 在光阑位置放一透明的平行壁离心池。具有最大折射率梯度的沉降界面的中心位于 B 处, 因此相应的像 B' 将在屏上有最大的位移。从界面上面或下面两侧来的光线不产生偏折, 它们落在中心线上。

界面出发的连续各点光线的位移是和相应的折射率梯度成比例, 结果在屏上画出一条光滑的连续曲线。对于单分散体系来讲, 这条微分曲线近似对称, 峰尖代表界面位置。多组分体系每一个不同的沉降组分均会出现一个峰或肩, 峰下的面积和每个组分的浓度成比例。

(二) Rayleigh 干涉光系统

单一狭缝光的衍射图象是一中间有一相当宽的明亮条纹和周围亮度渐弱的条纹组成。愈向外亮度愈暗。条纹的宽度与光的波长成正比, 而与光阑狭缝的宽度成反比。如果有两条狭缝, 明亮条纹中有细微结构, 这是因为光线通过两狭缝到达屏上距离不同, 显然它们将在中心明亮条纹水平不同位置产生干涉, 相互加强或抵销。条纹不像单光隙条纹是连续的, 而是明暗交替的状态, 就是所谓干涉条纹。为了在超离心机上应用干涉光方法检测样品沉降, 有必要强调指出干涉条纹间的空间与波长成正比, 条纹的数目取决于光阑上的缝隙数。

超离心机上安装的 Rayleigh 干涉光学系统装置是那种可以和 Schlieren 光学系统合用的装置, 只要改变 Schlieren 光学系统光源狭缝的方位 (转 90°), 因此即使在离心过程中两者也可轮番使用, 分别获得各自的图象。

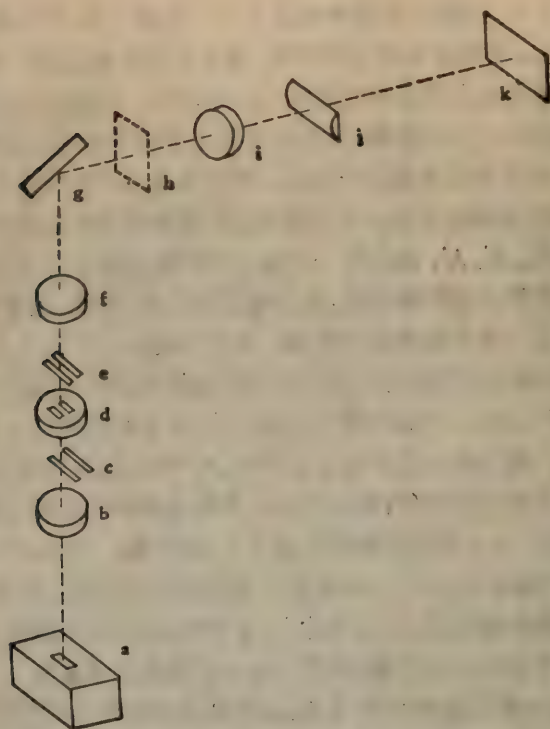


图 3-7 Rayleigh 干涉光学系统示意图

图 3-7 是 Rayleigh 干涉光学系统的示意图。从汞灯发出的光经过光隙 (a) 通过一干涉滤色片 (图上未画出), 准直镜 (b) 成平行光。平行光在一对嵌于离心池下窗座里的窄狭光隙 (c) (0.5mm 宽) 处分成两束分别透过离心池的两个液槽, 再穿过另一对缝隙较宽的狭缝 (e) 经聚焦镜 (f) 聚焦于 (h) 处。这两对狭缝是平行的, 并不沿着沉降的途径, 它们起到光阑的作用, 使得只有溶液槽直接在轴的直径方向时才有形成干涉的条件。h 就是 Schlieren 光学系统放 Schlieren 光阑 (相差片、小杆等) 的地方。以后干涉光经照相机 (i) 和柱形镜 (j) 至屏 (底片记录)。Schlieren 光学系统与 Rayleigh 干涉光学系统变换时, 只有两处要变动一下, 即光源光隙要转 90° (互成直角), 和 Schlieren 光阑在应用干涉光学系统检测时要避开。

如果离心池两槽中的液体是一样的, 例如都是溶剂, 条纹是直的。正中的条纹相当于缝隙成像的中心, 光线具有相同的光径长度。设此中心条纹为零条纹, 两侧的第一条纹与中心条纹相差一个波长, 两侧的第二条纹相差二个波长, 以此类推。把一槽的溶剂换成溶液, 条纹就会移位, 但仍保持平直。粗看一下图象, 看不出有任何变化。

之所以会产生条纹移位, 是因为通过一个槽的光因液体折射率变化改变了光程, 两束光要产生加强干涉, 它们必须在空气中有一相应的几何途径变化, 因此总的光程保持不变, 中心条纹和其他条纹移至与折射率改变有关的位置。如果垂直方向溶液不均一而是存在一个界面, 分成溶液和溶剂两个区域, 那末条纹将有平直的部分, 相当于离心池顶部和底部, 中间为一组相当于界面的曲线条纹相隔开。事实上, 每一条纹表示一条折射率对距离的曲线。由于中心衍射条纹宽度的限制, 超离心沉降分析的干涉光检测图谱上大约

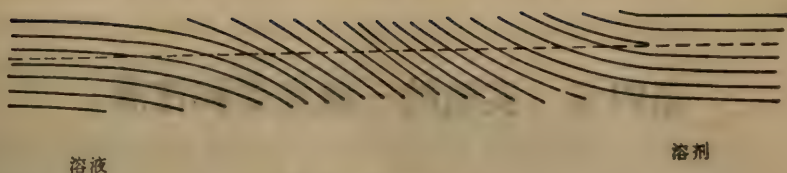


图 3-8

只可看到七条条纹。因此不可能跟踪一条条纹走过全部图象，除非界面上折射率变化非常少。界面条纹的移位可以直接用条纹数代表而不用条纹间距(图 3-8)，这样即使没有一个完整的图象，从跨越界面的条纹数也可以测量得很准确。即使条纹移位直至与条纹垂直，沿着某一条特定条纹计算跨越界面的条纹数，很容易测定条纹数目所表示的横向位移。条纹数 J 、离心池光径的厚度 a 和单色光波长 λ ，界面处折射率变化 Δn ，有下列关系：

$$\Delta n = \frac{J\lambda}{a} \quad (3-1)$$

在许多实验中，跨越界面约有二十条条纹，因为条纹数可测至约 0.04 条条纹，因此干涉光学系统检测灵敏度较 Schlieren 光学系统为高。

(三) 光吸收法

光吸收法检测的一个前提是溶液与溶剂必须有光吸收的差别，也就是说沉降组分必须有光吸收。所有用于分析超离心机的光学检测系统中光吸收法是最简单的一种，这也就不难理解为什么一开始分析超离心机就采用这个光学系统。光吸收法系统中由光源、滤色片产生某一波长一定强度的光，经一对透镜使平行光通过离心池后在光轴上某处聚焦，最后经照相镜在底片上感光成像。如果离心池装满溶液，此溶液吸收 90% 透过的光，那么到达底片的光是很少的，几乎不使底片感光。当粒子向离心池底部沉降时，液柱顶部会出现一个透明区(溶剂区)，透过这一部分的光使底片感光。在界面处由于浓度变化，吸收程度也不同，底片上感光的黑度也不同(图 3-9)。控制摄影条件，照相底片的黑度和沉降物质的浓度成比例，因此沉降物质的浓度是照相底片离轴心距离的函数。和干涉光学系统检测一样，光吸收法得到的也是浓度对距离作的曲线图，而不像 Schlieren 法是浓度梯度对距离的曲线。



图 3-9

光吸收法装置是简单的，但是实验操作却比较麻烦，需要严格控制条件。因为底片上的黑度受许多因素影响，如曝光时间、显影、定影条件、温度等，其中最大的困难是掌握底片曝光。底片的光强度对数和黑度的关系是 S 形曲线，要求曝光的光强度处在 S 形曲线中间成比例部分，才能有正确的结果。否则，曝光不足底片不感光，曝光过度黑度与曝光时间无关。

为了克服上述缺点，现在利用光电扫描记录沉降过程，但是这样一来装备就不再简单而变得复杂了。

第四章 实验的一般考虑和注意

一、样品制备

不同的超离心沉降分析技术对样品有不同的要求,这里只就共同之处叙述如下。如果样品是纯的,处在干燥状态,一般可称量后直接溶于合适的溶剂中应用。另外留出一定数量溶剂,以备双槽离心池或合成界面离心池用。溶液必须清晰或者近乎无色。超离心分析技术一般来讲是以不带电子作模型,而大部分生物样品在水溶液处于离子状态,因此有必要在溶剂中添加小分子无机盐类化合物,减弱蛋白质或核酸等生物高分子离子的电荷效应。溶剂的离子强度为 0.1 至 0.2 已足够抑制电荷效应。一般在溶剂中加入中性盐,如氯化钠,维持 0.1 至 0.2 克分子浓度。以混合溶剂溶解样品,样品必须对溶剂透析,特别是样品不纯或者样品不是干粉时,透析更为必要。这时外透液就作为双槽离心池或合成界面离心池的对照。透析处理还可减少样品中小分子量化合物的浓度。这些小分子量化合物在离心力场中会重新分布,浓度过高时,它们的分布情况会在 Schlieren 图象或干涉光图象中显示出来,干扰高分子化合物浓度的准确测定。此外,透析也克服了理论上处理三元体系中沉降的困难^[9]。真正的二组分溶液体系是合成的多聚化合物溶液,因为这些合成多聚化合物通常不带电荷。

二、离心机的使用及转头、离心池的选择

离心机应根据使用说明书进行操作,要强调的是必须仔细阅读,严格按照操作步骤进行工作。

对于一特定实验来讲,离心池、离心池组件和转头有最佳配合。

转头的选择取决于分析样品所需的转速、同时运转的离心池数量、离心池槽的容量以及操作温度。Beckman 公司出品的 Spinco E 型分析超离心机各种转头的特性和用途见表 3-1。最常用的是标准型 An-D 转头或 An-H 转头,样品溶液稀时,用 An-E 转头。做沉降平衡分析可以用 An-G 转头,同一时间内分析几个样品,比较方便。

离心池的选择首先决定于光学检测系统。干涉光系统和光电扫描系统必须用双槽离心池。Schlieren 光学系统也常常用双槽离心池,以便同时得出基线。不过双槽离心池的最高允许转速较单槽离心池低。离心池池芯的选择取决于最高允许转速、化学稳定性、构造和厚度。池芯材料和厚度(见第三章第 3 节)的选择取决于待分析的样品溶液。铝合金制池芯虽已使用多年,但化学稳定性不佳,现在正逐步被塑料制池芯取代。只是在高温或在某些特殊溶剂中进行超离心沉降分析时才使用铝合金池芯。水溶液样品最好选用铝粉填充的树脂池芯。如有需要绝对避免和铝接触,可选用碳粉填充的环氧树脂或 KclF 池芯。池芯标准厚度是 12mm。因为 Schlieren 光学系统得到的曲线中的峰高以及干涉光系统得到的图象中干涉条纹的移位都与光径(池芯厚度)和溶液浓度成比例,选择不同的池芯

厚度可以扩展待测样品溶液浓度范围。例如用 30mm 厚池芯摄得的 Schlieren 峰面积为 12mm 厚池芯摄得的峰面积的 2.5 倍。反之，用 1.5mm 厚池芯则仅为 12mm 厚池芯的 1/8。各种池芯需要的样品数量见表 4-1。

表 4-1 离心池液槽的容量

液槽扇形角度 (度)	容 量 (ml)					
	池 芯 厚 度 (mm)					
	1.5	3	6	12	18	30
2.0		0.10		0.39		
2.5				0.48	0.72	1.20
4.0	0.10	0.20	0.39	0.78	1.17	1.95

石英做的池窗适用于所有实验，但是用光电扫描装置检测或者转速大于 40,000rpm 下用干涉光系统检测时，宜用蓝宝石窗。用楔形池窗虽可同时分析一个以上样品，不过，如果要求实验结果精确，必须用平面池窗。

抗重离心池虽有两种，但是用于干涉光系统的抗重离心池也可用于 Schlieren 光学系统和光吸收法。

三、光学系统的选择

根据实验的目的、样品的性质来选择适当的光学检测系统。表 4-2 是分析超离心机

表 4-2 各种光学检测系统的特征

	Schlieren 光学系统	Rayleigh 干涉光学系统	光吸收光学系统	
			紫外摄影法	光电扫描装置
主要用途	沉降速率法 鉴定纯度	沉降平衡法 测定样品浓度	沉降速率法测定低 浓度样品 区带沉降速率法密 度梯度沉降平衡法	沉降速率法（低浓 度样品） 沉降平衡法（低浓 度样品） 密度梯度沉降平衡 法
其他用途	沉降平衡法 测定样品浓度	测定扩散系数 沉降速率法		差分沉降速率法
常规测定浓度范围 (12mm 池芯)	1.0—10mg/ml	0.5—5mg/ml	蛋白质 0.1—1mg/ml 核酸 0.01—0.1mg/ml	蛋白质 0.05—1.0mg/ml 核酸 0.01—0.1mg/ml
优点	直接观察离心过程 直接测定浓度梯度观 察不均一性 灵敏度可变（改变 相差片角度）	直接观察离心过程 直接测定相对浓度高 精度	可测低浓度样品， 有可能分别单独观察 多组分体系的各组分	可测低浓度样品， 直接观察离心过程 直接得到绝对浓度
缺点	溶剂中盐浓度高时 可能干扰 要积分才能得到浓 度 精度较低	要得到浓度梯度需 要微分 离心池的位置非常 敏感，位置不正有很 大影响	不能观察离心过程 定量测定样品浓度 困难 光学系统对油污和 灰尘很敏感	光学系统对油污和 灰尘很敏感

上装置的各种光学系统的特征。

除了光电扫描装置用记录仪记录实验结果外,其余的检测方法都用摄影方法来记录。由于光线较弱,摄影用的底片宜用感光度高的。曝光时间需由实验具体情况决定,一般都比较长。用 Schlieren 光学系统和 Rayleigh 干涉光学系统要选择获得的图谱有最大反差的曝光时间,以方便以后的读片。底片的显影、定影等无特殊要求,不过光吸收摄影法检测时要特别小心,至少要让冲洗出来的底片上黑度和离心池中光密度有半定量关系,这就要求各项操作条件尽可能保持一致,以便获得重复结果。

四、沉降图谱的分析

应该用微比长仪阅读底片。Schlieren 图谱也可用优良的放大机阅读。微比长仪能阅读长、宽各 5cm 的底片,精度为 $1-2\mu$ 。由于放大,图谱中的线条都有一定宽度,通常以线的中心位置来计算。至于界面位置的精确测定,尚有一些争议,一般以界面宽度的中心作为界面位置。

(一) Schlieren 图谱阅读法

图 4-1 是典型的 Schlieren 沉降图谱,各部分的名称见图注。Schlieren 图谱是 dn/dr 对 r 作图(其中 n 是折射率, r 是距轴心的距离)。在实验允许的准确度范围内,溶液折射率的变化 dn 和样品浓度的变化 dc 成正比,因此 Schlieren 图谱可以看成是 dc/dr 对 r 作

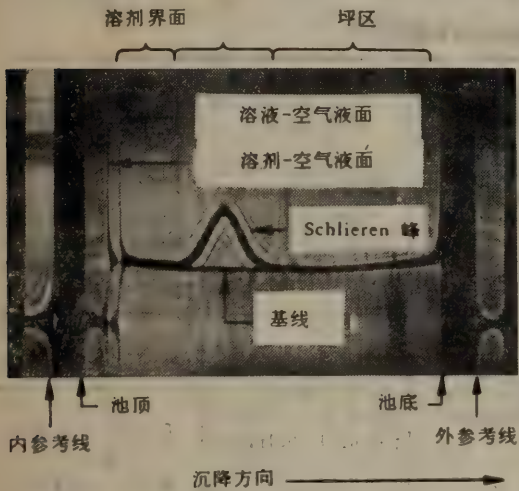


图 4-1 Schlieren 图象

表 4-3 角的正切

扇形角 θ	$\tan \theta$
30°	0.57735
35°	0.70021
40°	0.83910
45°	1.0000
50°	1.1918
55°	1.4281
60°	1.7321
65°	2.1445
70°	2.7475
75°	3.7321
80°	5.6713
85°	11.430

图。Schlieren 图谱中的峰表示界面区域,峰的最高点所在的位置一般就作为界面的位置。基线和峰之间的面积和浓度成正比。不过 dn/dr 的值和 Schlieren 光学系统中的相差片角度 θ 有关,因此用峰的面积来表示浓度时,这个 θ 角度要一定。否则,要把 dn/dr 的值乘以相差片角 θ 的正切 ($\tan \theta$) (表 4-3),才能把不同的 θ 拍的 Schlieren 图谱进行比较。

1. 放大倍数 沉降分析计算中都是以沉降粒子径向外移的距离来计算,所以底片

上的大小必须换算成相应的在离心池中实际的大小，也就是要计算出底片的放大倍数。
X 轴方向，即距轴心距离的放大倍数，是通过测量底片上抗重离心池的内侧基准线 and 外侧基准线之间的距离和实际的抗重离心池的内侧基准线 and 外侧基准线之间距离之比来实现的。也可用一校正离心池来计算。所谓校正离心池系在离心池中以一有精确刻度平行线的镜片代替池芯。从底片上精确测量各平行线间的距离，然后除以镜片上各平行线的实际距离，计算放大倍数。

底片上的 Y 轴方向即 dn/dc ，一般不作照相镜放大倍数校正，因为 Schlieren 图谱中垂直方向的位置是表示离心池中溶液浓度梯度引起的光的折射，沉降分析中常用相对值计算，故不必作放大倍数的校正。

2. 离轴心距离的测定 置底片于微比长仪下，沿底片的基线，准确读出各有关部分的读数，准确到 10μ 。

[例] Schlieren 图谱如图 4-1。

	内侧基准线	液 面	界 面	外侧基准线
微比长仪读数 (mm)	6.050	$\begin{matrix} 9.575 \\ 9.655 \end{matrix} > 9.615$	16.915	38.855

放大倍数 $F = \frac{(3.8855 - 0.6050)}{(7.30 - 5.70)} = 2.05$

其中 7.30，5.70(cm) 分别是抗重离心池外侧基准线和内侧基准线在转头中距轴心的实际距离。

液面至轴心的距离 $r_m = 7.30 - \frac{(3.8855 - 0.9615)}{2.05} = 5.87\text{cm}$

界面至轴心的距离 $r = 7.30 - \frac{(3.8855 - 1.6915)}{2.05} = 6.23\text{cm}$

铝合金转头在高速运转时会伸展，基准线有所变动。伸展的程度随转速、转头使用次数不同而不同，很难准确测定，好在此值不大 (60,000rpm 时约伸展 0.02—0.04cm)，除非特殊要求，通常测定时均忽略不计。

3. 峰下面积的测定 一种方法如图 4-2 所示，把峰分割成一系列小块，每一小块近似作为梯形计算面积。例如 ABCD 的面积是 4 位置上峰的高度乘以水平方向增量 CD。整个峰的面积近似于各梯形面积之和。具体计算时，沿底线每隔微比长仪上读数 0.1cm 为一间隔。从原点开始，沿底线移动 0.05cm (微比长仪读数)，读出该点峰高 (dc/dr)，作为第一个峰高值。以后每次移动 0.1cm (微比长仪读数)，读一次峰高。如是循序前进，直至读完整个峰。通常峰宽不是间隔的整数倍，但是由于尾数引起的误差极微，可以忽略不计。峰面积相当于 $\frac{0.1}{F} \sum (dc/dr)$ ，其中 F 是水平方向放大倍数。这个值的单位是 cm^2 ，相应于溶液浓度。采用 Schlieren 光学系统检测的超离心沉降分析实验，有关浓度的计算通常可以直接将此值代进去，而不需要转换成绝对浓度单位。

另外一种计算峰面积的方法是把底片放在照相放大机下放大 10 倍，投影在方格计算纸上计算峰下的面积。注意，假如采用微比长仪得到的水平方向的放大倍数是 F，那末这里计算时放大倍数应是 F 和放大机放大倍数之和。当然用电子求积仪测量峰面积就更

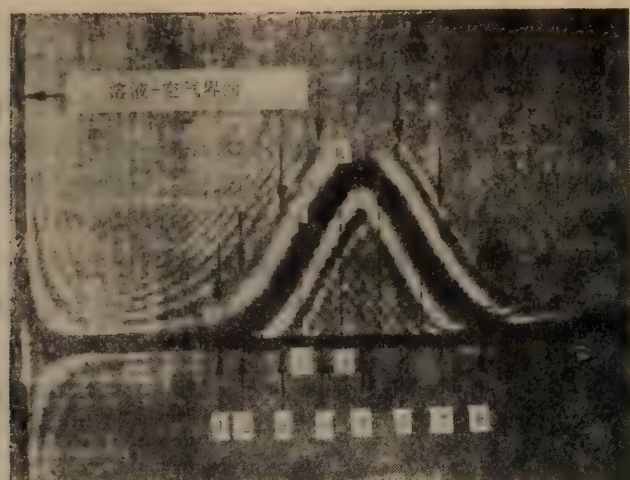


图 4-2 Schlieren 峰面积的计算

方便了。

(二) Rayleigh 干涉图形的读法

图 4-3 是典型的干涉条纹图。每一条纹表示离心池中溶液浓度和距离的关系，也就是浓度 C 对距离 r 作的图。当然这里有一个前提，就是浓度 C 和折射率 n 呈线性关系。图上条纹垂直方向移位表示两部分液体之间溶质浓度的变化。条纹位移值 Δj 代表浓度，单位是条纹数，或者移动距离 μm 或 cm 。这个单位可以保留代入浓度项直接进行计算。两个条纹平坦部分条纹在垂直方向移动距离，或者跨越界面的总条纹数 J ，表示界面的浓度变化。因此，溶液相和溶剂相平坦部分条纹在垂直方向的移位也就代表离心池中坪区的浓度。对蛋白质来讲，使用 12mm 厚池芯离心池，一条条纹移位(约 300μ)相当于溶液浓度 0.025mg/ml 。

界面位置的确定，最简单的方法是取浓度变化一半时的位置 r 作界面位置，也就是条纹垂直位移的中点。底片在比长仪下阅读时，应保持抗重离心池两参考孔的同一条纹在

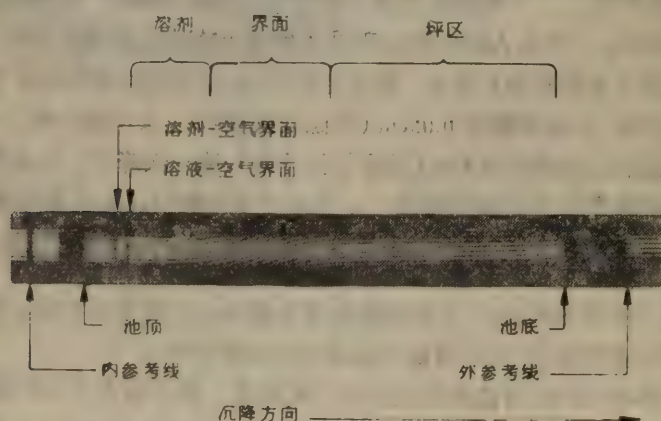


图 4-3 Rayleigh 干涉图形

一直线上。必须注意,抗重离心池两参考孔中的条纹数并不一样。和 Schlieren 图谱不一样,放大倍数不是用抗重离心池两参考孔来计算,而是用抗重离心池外参考孔的外侧基准线和参考线中心来计算。两者(外侧基准线和参考线中心)的距离为 1.67cm。底片上各点的相应离心池位置的计算和 Schlieren 图谱一样,不过是从抗重离心池的参考线中心算起。参考线中心距轴心 5.62cm。底片在水平方向读数应准确至 10μ ,不足一条纹时应读至 1μ 。

1. 条纹间宽度测定 邻近两条条纹间垂直方向的间隔是一个重要的常数,决定于光源波长、底片至离心池的距离等因素。每一架超离心机有一定值,也就是说每一架离心机此值要分别测定。测定的方法很简单: 选择底片上条纹呈水平的地方的一条明亮条纹,测量此明亮条纹中心至下一条明亮条纹中心之间距离,此距离就是条纹间宽度。为了增加准确度,应该测量几条清楚的条纹间的距离,然后以此条纹数除之,取其平均值。一

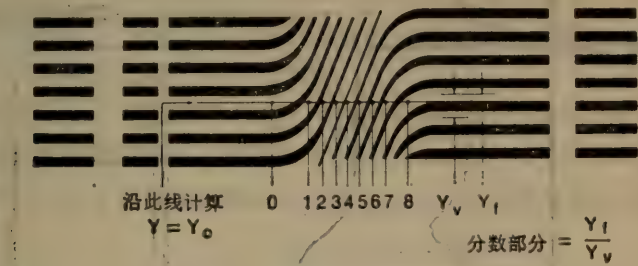


图 4-4 Rayleigh 图形读数法

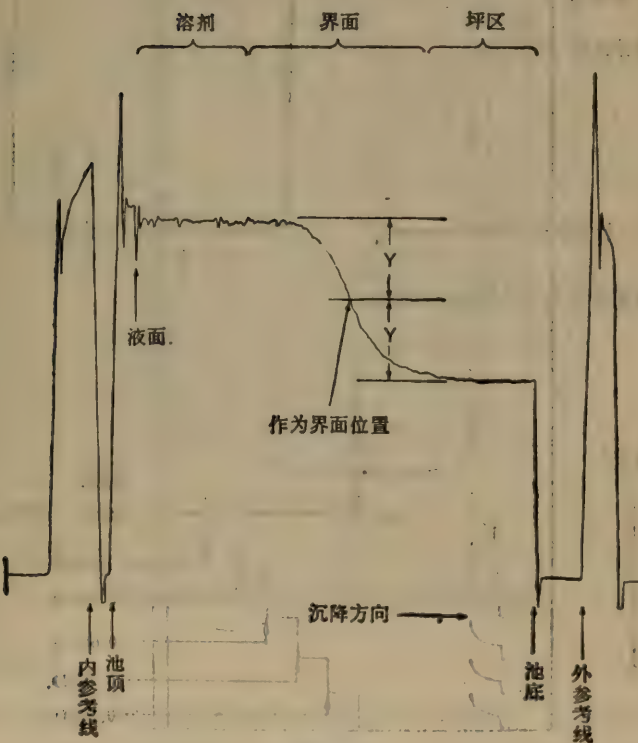


图 4-5

般约为 300μ ，读数误差应小于 5μ 。注意这里测量的条纹间隔并不校正照相镜的放大倍数。

2. 条纹移位距离的测定 以前已经提到，干涉条纹的垂直方向位移代表浓度，具体读片方法如下(图 4-4)。在干涉光图谱上条纹平坦部分选择一条清晰的明亮条纹，取其中心线，定为 Y_0 。在比长仪下平行于该条纹移动，计算与之相交的明亮条纹数，直至代表坪区的条纹处止。整数条纹之外的不足一条条纹的分数条纹移位的读法如下。这时不再水平移动而是垂直移动测量至该明亮条纹中心线，记下此数 Y_1 ，然后以条纹间宽度 Y ，(测量方法见上面 1) 除之，得到条纹移位的分数部分。将此分数加于整数部分即为整个

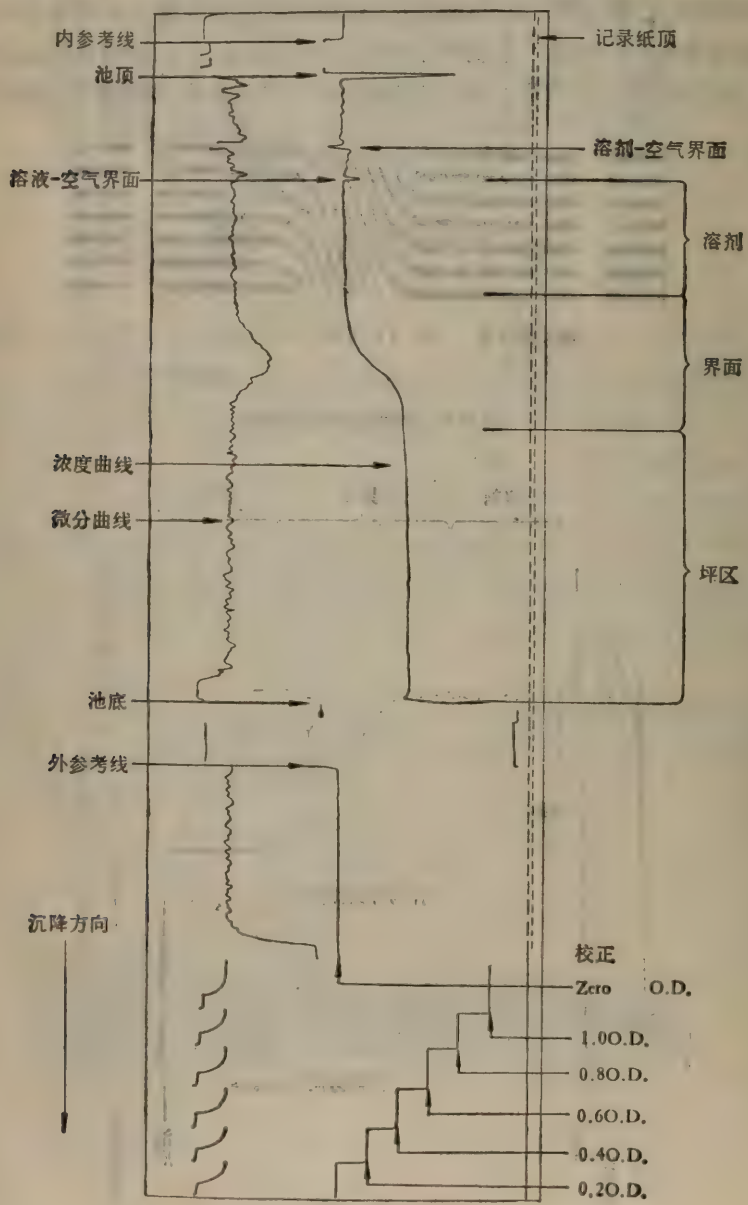


图 4-6

条纹移位数。

沉降平衡法所得干涉光图谱溶液相两端(液面和液底)阅读有困难,变通的方法是把条纹移位对距离 r 作图,外延至液面和液底。液面处的条纹一般不太陡峭,外延没有什么困难。液底处即使用了垫底液(氟油)仍非常陡峭^[10],通常用目测法外延已能满足要求。

(三) 光吸收法图谱的读法

光吸收法检测有两种记录方式。摄影记录,底片的黑度要用光密度计阅读。图 4-5 是光密度计扫描得到的图谱。由于大部分实验结果计算只需要知道图谱上一些特定部位距轴心的距离(如液面,界面中心等),这些部位的测量方法基本上同 Schlieren 图谱和干涉光图谱。不过记录纸上是以 cm 为单位,放大倍数是光学系统放大倍数和光密度计放大倍数的乘积,数值是记录纸上抗重离心池两基准线间的距离和离心池两参考孔实际长度(1.60cm)之商。界面位置通常取溶剂相区和坪区的中值和曲线相交处(移动界面沉降法),区带沉降法则取峰的最大值处。这种用摄影方法记录的光吸收法对摄影条件要求严格控制,操作手续麻烦,并且缺乏足够的精度。

光吸收法检测的另一种记录方式是光电扫描,在离心过程中直接记录离心池中液体的光密度。记录纸上的图谱如图 4-6 所示。阅读的方法和上面所述一样。离心池中液体的光密度值应和记录仪上记录笔的移动距离成正比,如果不成线性关系,那末要作一校正曲线(图 4-7)。

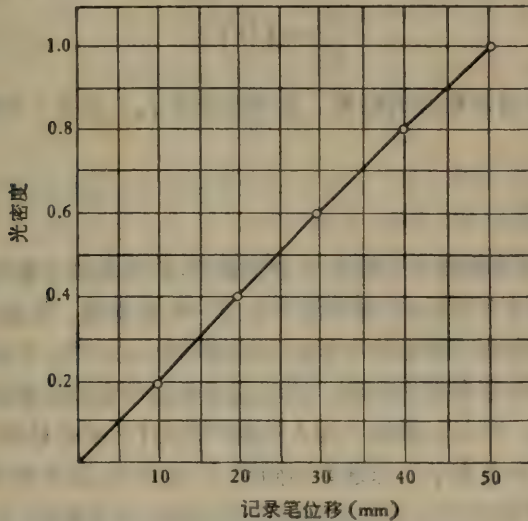


图 4-7 校正曲线

五、离心分析实验应考虑的现象

(一) 浓度依存性

高分子溶液在超离心机中的流体力学性质是浓度的函数。样品溶液在某一浓度沉降分析得到的数据只是表示该浓度观察到的数值,应该在报告中将浓度一并报告。对浓度

的依存程度,不同的物质是不一样的。一般讲来,球状蛋白质比较小。纤维状蛋白质或者核酸等就非常大,必须在可以检测的浓度范围内进行一系列实验,然后外延至无限稀释处(溶质浓度为零时)。通常高分子的沉降系数在浓度高时变小。如果相反,在高浓度时沉降系数增大,可以考虑溶质分子相互作用成为聚合物的可能,也可能在低浓度时溶质分子解聚成亚基。沉降平衡法测定分子量,溶液在非理想状态时观察到的值小于真实值。

(二) 平方根稀释定则

因为池芯中盛放样品溶液的槽的截面是扇形,离心过程中界面下的坪区浓度将会降低,反映在 Schlieren 图谱上峰变小,干涉条纹移位减少。从式(2-8)坪区浓度随时间的变化将是

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -2s\omega^2 C \quad (2-8)$$

根据沉降系数的定义

$$S \equiv \frac{1}{\omega^2 r} \frac{dr}{dt} \quad (2-2)$$

代入式(2-8)得

$$\frac{dc}{c} = -2 \frac{dr}{r} \quad (4-1)$$

其中 $r = r(t)$, 是界面的位置。积分之,时间 t 的浓度 C_t 和初浓度 C_0 的关系

$$\frac{C_t}{C_0} = \left(\frac{r_0}{r_t} \right)^2 \quad (4-2)$$

其中 r_0 是时间为 0 时界面距轴心的距离,通常即液面 r_m ; r_t 是 t 时间界面距轴心的距离。

(三) 电荷效应(盐效应)

蛋白质、核酸等许多生物高分子是高分子电解质,在水溶液中解离成离子。沉降过程中,由于正、负离子沉降速度不同,在离心池中形成一电位梯度。根据电中性原则,带电荷粒子在离心力场中的分布和不带电的中性粒子的分布就不一样。电荷效应不论是沉降速率法还是沉降平衡法都会带来很大影响。这种高分子离子之间的电荷效应叫第一电荷效应。为了降低这个效应,可以在溶液中加入适量中性盐(如氯化钠等)。不过加入的小分子支持电解质的正离子和负离子沉降速度不同时(如氯化铯、碘化锂等),也会影响高分子离子的沉降速度(第二电荷效应),因此要有区别地选择支持电解质,这一点是很重要的。

根据高分子的离子化程度,一般加入正、负离子沉降速度几乎相同的中性盐(如氯化钠),维持 0.1 至 0.2 离子强度,高分子离子影响最小。至于因加入其他盐类改变了溶剂的粘度和密度,可以观察到沉降系数的变化,为此沉降系数必须换算成标准状态: 20℃ 纯水中的值。

(四) Johnston-Ogston 效应

如果样品溶液中有不止一个组分沉降,会产生另一种浓度依存关系,即所谓 Johnston-

Ogston 效应。多组分体系沉降过程中, 不仅发现各组分的沉降速度和各自单独沉降不一样, 而且 Schlieren 图谱中峰下相对面积也不反映各组分之间相对浓度。将样品溶液稀释可观察到, 总的峰面积中沉降慢的组分所占比例减少, 而沉降快的组分增加。这个效应在低浓度时可忽略, 浓度越高越显著。Johnston-Ogston^[11] 指出, 这个不正常现象的出现是由沉降物质的特性所决定。一个二组分混合体系沉降分析时会看到两个界面, 在快组分沉降时也夹杂着慢组分的沉降, 不过这部分慢组分和快组分后面的那部分慢组分有不同的沉降系数(s) (图 4-8)。因此这里有三个 s 值, 这些 s 值之间的相对值影响混合物离

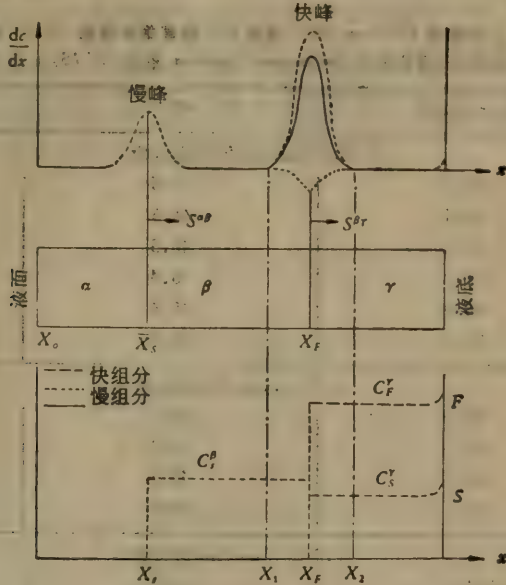


图 4-8

心沉降的结果。经 t 时间离心, 离心池中有三个相: (1) α 相, 由纯溶剂组成; (2) β 相, 含有慢组分, 其浓度为 C_s^β ; (3) γ 相, 具有两种组分, 慢组分和快组分, 它们的浓度相应为 C_s^γ 和 C_F^γ 。假定这些相之间界面都是无限陡峭, 分别称为 $\alpha\beta$ 界面和 $\beta\gamma$ 界面。 \bar{r}_s 处界面 $\alpha\beta$ 有一沉降系数 s_s^β , \bar{r}_F 处界面 $\beta\gamma$ 有一沉降系数 s_F^γ 。因为 γ 相中浓度较高, 而沉降系数依存于浓度, s_F^γ 将小于 s_s^β 。要慢组分在 X_1 、 X_2 之间不堆积, 必须在 $\beta\gamma$ 界面两侧校正慢组分的浓度来补偿沉降系数差。慢组分和快组分的相对移动可写成 $s_F^\gamma - s_s^\beta$, 当净增加为零时

$$C_s^\beta (s_F^\gamma - s_s^\beta) = C_F^\gamma (s_F^\gamma - s_s^\beta) \quad (4-3)$$

实验中观察到的慢组分浓度 (用 $\alpha\beta$ 界面峰的面积计算) $C_s^\beta = C_s^{\text{obs}}$ (obs 表示观察值), 较池底部分的慢组分真实浓度为大 (C_s^γ 作扇形槽面稀释校正), 其值决定于三个沉降系数。如果 $s_F^\gamma = s_s^\beta$, 即在快组分的稀溶液中实验观察到的相对浓度是正确的。另一方面, 在快组分高浓度的溶液中, 特别是那些快组分沉降系数浓度依存性大的, $s_F^\gamma \ll s_s^\beta$ 和 $C_s^\beta > C_s^\gamma$ 。浓度依存性小的球形分子, Johnston-Ogston 效应大致可以忽略。但是一些非对称大分子, 特别是沉降系数接近的混合组分影响就大了, 不能忽视 (表 4-4)。因此, 对于未知的混合物样品, 如要知道它们相互之间浓度之比时要作校正。校正方法之一, 是测定一系列样品浓度沉降图谱上两组分的显示相对浓度, 然后外延至零浓度。组分间相对

表 4-4 快组分对不同慢组分的效应^[12]

快 组 分			慢 组 分			$\frac{C_0^{obs}}{C_0^e}$
物 质	浓 度 (g/100ml)	S_F (S)	物 质	浓 度 (g/100ml)	S_s (S)	
烟草花叶病毒	1.0	137	丛矮病毒	0.5	126	2.7
烟草花叶病毒	1.0	117	纤维蛋白原	0.5	8.1	1.0
纤维蛋白原	2.0	5.4	牛血清白蛋白	0.5	4.1	2.5
纤维蛋白原	2.0	5.3	乳球蛋白	0.5	2.7	1.5

表 4-5 丛矮病毒 (0.3mg/ml) (慢组分)-烟草花叶病毒 (0.2—1.0mg/ml) (快组分)混合物的 Johnston-Ogston 效应 ($S_s^e/S_F^e = 0.700$)

底片编号	$(\bar{r}_s/r_m)^2 C_0^{obs}$	C_0^{e*1}	σ^{*2}
0.3—0.2mg/ml 混合物			
5	62.0	47.6	0.713
6	60.6	46.5	0.721
7	61.5	48.3	0.710
8	60.1	46.4	0.721
9	58.9	45.4	0.724
10	58.9	45.5	0.726
0.3—0.4mg/ml 混合物			
4	87.9	49.0	0.706
5	87.1	49.2	0.705
6	84.7	47.5	0.715
7	82.1	50.2	0.699
0.3—0.6mg/ml 混合物			
5	114.8	53.1	0.682
6	108.6	50.9	0.695
7	107.8	52.7	0.684
8	102.1	49.7	0.702
9	98.9	48.6	0.704
10	94.2	46.4	0.721
0.3—0.8mg/ml 混合物			
6	157.4	48.6	0.708
7	145.4	54.1	0.680
8	147.9	50.1	0.700
9	137.6	48.7	0.704
10	131.4	48.5	0.709
11	126.0	47.6	0.714
0.3—1.0mg/ml 混合物			
8	201.0	51.3	0.692
9	199.8	54.4	0.676
10	191.9	51.4	0.692
11	174.5	49.5	0.703
12	174.4	51.1	0.694
13	182.4	50.2	0.698

*1 $\sigma = S_s^e/S_F^e (=0.700)$ 用式 (4-4) 求的值。*2 用已知相对浓度 C_0^e 计算值。

显示浓度的测量，应使界面沉降至相近部位进行，以避免由于径向稀释引起另一种复杂性。这个方法不适合用于稀释过程中组分之间存在可逆平衡体系。可以用 Trautman 等^[13]的近似处理计算某一浓度混合组分样品内组分浓度比

$$C_i^0 = \frac{(\bar{r}^{obs}/r_m)^2 C_i^{obs}}{\mu}$$

$$\mu = \frac{(\bar{r}_F^{obs}/r_m)^{2(1-\sigma)}}{(\bar{r}_F^{obs}/\bar{r}_S^{obs})^2 - 1} \tag{4-4}$$

其中 $\sigma = \int_0^1 S_i^S dt / \int_0^1 S_F^S dt$ 。实际求相对浓度 C_i^0 时，可以近似 $\sigma = S_i^0 / S_F^0$ ， S_i^0 ， S_F^0 是极限沉降系数。 S_i^0 是把各浓度慢组分的显示沉降系数对各显示浓度作图，外延至零浓度时之值。 S_F^0 是快组分的显示沉降系数对各显示浓度或总浓度作图，外延至零浓度取值。表 4-5 是 Trautman 等用已知混合组分样品做的实验的结果。

第五章 沉降速度的测定

分析超离心机最大的用途之一就是测定沉降速度。理由很清楚,因为一次实验只要少量样品(几毫克以下),在很短时间(一个小时或稍多一些)就能得到几个重要的信息。首先可确证是否存在高分子,它的含量大概是多少。其次可以计算沉降系数,结合界面扩散的形状估计高分子大小,检测分子不均一性以及混合物中各组分之间的比例。不过从一次离心实验就对沉降粒子的物理性状下结论是非常危险的,如有可能应和其他分析技术平行测定。

一、移动界面法测定沉降系数

溶质分子在单位离心力场中的沉降速度称为沉降系数,以 S 表示:

$$S = \frac{1}{\omega^2 r} \frac{dr}{dt} \quad (2-2)$$

其中 r 是距轴心距离, t 是时间, ω 是角速度。单位是 Svedberg (简称为 S, 10^{-13} 秒)。通常报道的沉降系数 $S_{20,w}$ 是指溶质在 20°C , 和水密度、粘度一样的溶剂中的沉降速度。要换算成这个状态必须知道实验温度时溶液的密度和粘度,以及溶质的偏微比容。在接近 20°C 测定稀溶液的沉降系数,所得 S 值一般可直接应用不需作校正。沉降系数是浓度的函数,无限稀释时溶质的沉降系数 $S_{20,w}^0$ 是测定一系列浓度的 $S_{20,w}$, 外延至零浓度的值。外延不一定是直线(图 5-1),因此实验时样品浓度应尽可能低,以缩短外延距离。

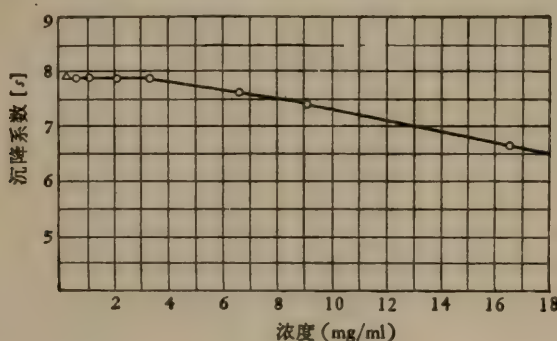


图 5-1

移动界面法是测定沉降系数最常用的方法。从界面移动求粒子沉降系数误差一般在 $\pm 2\%$ 左右。操作上可以引起误差的主要因素有三个: (1) 温度测量不准; (2) 转头转速不稳; (3) Schlieren 峰的位置没有定准。因此应可能使样品溶液温度和测定温度一致, 达成平衡, 转速保持在指定转速, Schlieren 图谱上峰尖一些。

(一) 实验方法

1. 样品配制 样品事先应尽可能纯化,准确测定溶质浓度、溶剂的盐浓度。溶质浓度随溶质分子形状不同而不同。Schlieren 图谱中峰的扩散和溶质分子的扩散系数成比例,因此扩散系数大的球状分子要在比较高的浓度(12mm 池芯 2—10 mg/ml)进行测定,而像胶原之类棒状分子可在较低浓度(0.2—1.0mg/ml)测定。用紫外吸收光学系统检测时,由于核酸在 260nm 波长处有很强的吸收,12mm 池芯离心池,样品浓度只要 0.2—1.0O. D./ml。多数生物高分子样品溶液的溶剂,为了抑止电荷效应,选在溶质等电点附近的 pH,并且加氯化钠等中性盐至离子强度 0.1—0.2。12mm 池芯的离心池每次实验液体用量如下:

单槽池(扇形角 4°)	溶液	0.8ml
(扇形角 2°)	溶液	0.4ml
双槽池(扇形角 2.5°)	溶液	0.5ml
	溶剂	0.5ml (外透液)
合成界面单槽池(扇形角 4°)	溶液	0.45ml
	溶剂	0.1ml (外透液)

2. 实验条件

(1) 离心池: 按照表 3-2 挑选合适的池芯材料,不同结构的离心池芯可参考下列情况选择:

单槽池: 均一样品, S 值不太小(球状分子 $S > 2$)

双槽池: 溶剂本身浓度梯度大(高浓度盐溶液,高浓度脲、盐酸胍溶液)

不均一样品的组成分析

合成界面单槽池: 样品 S 值小

溶剂本身浓度梯度大(溶剂本身的浓度梯度掩盖界面位置)

(2) 转速: 转速决定于界面移动的速度,太快太慢都不好。一般转速选在运转一小时后界面移至离心池液柱中部为宜。具体数值参考表 5-1。

表 5-1 沉降系数和转速

沉降系数 $S \times 10^{13}$ (秒)	转速 (rpm)
≤ 5	转头允许最高转速
10	50,000
20	35,000
30	28,000
40	25,000
50	22,000
100	15,000

离心加速过程中要随时观察离心池是否存在渗漏,以及样品溶液中是否存在低速即能沉降的组分。

(3) 摄影: 两次摄影的间隔时间一般选在界面沉降至离心池液柱中部这一段时间内摄影十次,曝光时间随光源、底片而异,曝光时间短于 20 秒可得良好的照片。

分别正确记下离心开始时间、到达指定速度的时间、每一次摄影的时间、曝光时间,用 Schlieren 光学系统时还要记下每一张照片拍摄时相差片角度。

3. 沉降系数的计算

(1) 显示沉降系数: 根据沉降系数的定义,式(2-2)改写成:

$$s = \frac{2.303}{60\omega^2} \left(\frac{d \log r}{dt} \right) \tag{5-1}$$

其中 r 是轴心至沉降界面的距离,单位是 cm; ω 是角速度,单位是

$$\text{弧度/秒} = \text{转速 (rpm)} \times \frac{2\pi}{60};$$

t 是时间,单位是分。

从不同时间摄的底片,在微比长仪下测量界面位置 r ,以 $\log r$ 对时间 t 作图,从所得直线求出斜率,计算沉降系数。

[例] 样品: 牛血清白蛋白, 5mg/ml

溶剂: 0.1M 磷酸缓冲液, pH7.0

转速: 59.780rpm

温度: 19.7℃

在十张底片上测量的界面位置的数值列于表 5-2 中。以 $\log r$ 对 t 作图(图 5-2), 直线斜率:

$$d \log r / dt = \frac{0.0290}{72} (\text{分}^{-1}) = 4.029 \times 10^{-4} (\text{分}^{-1})$$

表 5-2 牛血清白蛋白沉降系数的计算

底片编号	时间(分)	ΔX^{*1} (底片上) (mm)	$r = 7.30 - \frac{\Delta X}{F}$ (cm) ^{*2}	$\log r$
1-1	6	21.680	6.242	0.7953
1-2	14	20.770	6.282	0.7986
1-3	22	19.850	6.330	0.8014
1-4	30	18.905	6.378	0.8047
1-5	38	17.865	6.429	0.8078
2-1	46	16.990	6.471	0.8110
2-2	54	16.005	6.519	0.8142
2-3	62	14.950	6.571	0.8176
2-4	70	13.970	6.619	0.8208
2-5	78	13.020	6.665	0.8238

*1 ΔX 是底片上界面和外侧基准线之间的距离。

*2 F 是水平方向放大倍数 (=2.05)。

从表 5-3

$$\frac{2.303}{60\omega^2} = 9.797 \times 10^{-10}$$

$$\begin{aligned} S_{\text{显示}} &= \frac{2.303}{60\omega^2} \cdot \frac{d \log r}{dt} = (9.797 \times 10^{-10}) \times (4.028 \times 10^{-4}) \\ &= 3.94 \times 10^{-13} = 3.94S \end{aligned}$$

$\log r$ 对 t 作图不成直线,可能是由于径向稀释,界面前部溶质浓度降低,显示沉降常数变大(曲线向上弯);或者是离心池底溶剂的粘度、密度因压力变大而变大,溶质显示沉降系数变小(曲线向下弯)。遇到这种情况,求出每一个 t 时间的显示沉降系数 S_t ,以 S_t 对 t 作图,外延至 $t \rightarrow 0$,此时的显示沉降系数相当于起始浓度、一大气压下的沉降系数。用水作溶剂时,粘度、密度对压力的依存性非常小,可以忽略。而用有机溶剂,当这种影响表现明显时,需要予以校正。

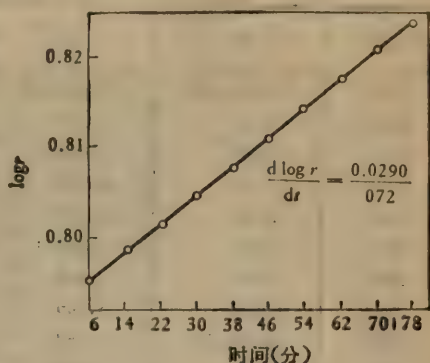


图 5-2 $\log r$ 对 t 作图

界面不对称的情况:例如溶质不均一或者沉降系数浓度依存性很大, Schlieren 峰在溶剂一侧异常陡峭(陡峭效应)。这时界面位置将不再是在峰的最高处,必须用浓度分布的二次矩的平方根 $(\bar{r}^2)^{1/2}$ 。Schlieren 方法检测时,测量图谱上各 r 点的 $\partial c / \partial r$,按下式计算 $(\bar{r}^2)^{1/2}$ 。

$$\bar{r}^2 = \frac{\int_{r_m}^{r_p} r^2 \left(\frac{\partial c}{\partial r} \right) dr}{\int_{r_m}^{r_p} \left(\frac{\partial c}{\partial r} \right) dr} = \frac{\sum_{r_m}^{r_p} r^2 \left(\frac{\partial c}{\partial r} \right) \Delta r}{\sum_{r_m}^{r_p} \left(\frac{\partial c}{\partial r} \right) \Delta r} \quad (5-2)$$

其中 r_m , r_p 分别是轴心至液面和坪区的距离。

如用干涉光系统,测定每一变化的条纹中心至轴心的距离,用下式计算:

$$\bar{r}^2 = \frac{\int_{r_m}^{r_p} r^2 dc}{\int_{r_m}^{r_p} dc} = \frac{\Delta j \sum_{r_m}^{r_p} r^2}{J} \quad (5-3)$$

其中 $\Delta j = 1$ (条纹), $J =$ 溶剂相和坪区之间条纹移位(单位:条纹数)。

(2) 标准状态的换算: 为了比较起见,不同温度、不同溶剂中测定的样品沉降系数要换算成标准状态下的 S 值。沉降系数的标准状态定为 20°C , 溶剂的粘度、密度和水的粘度、密度一样。换算公式如下:

$$s_{20,W} = s_{\text{显示}} \left(\frac{\eta_{T,\text{solv.}}}{\eta_{20,W}} \right) \left(\frac{(1 - \bar{V}\rho)_{20,W}}{(1 - \bar{V}\rho)_{T,\text{solv.}}} \right) \quad (5-4)$$

其中 η 是粘度, ρ 是密度, \bar{V} 是溶质的偏微比容,脚注 T , solv, 20, W 分别表示测定温度, 溶剂, 20°C 和纯水。假定溶剂和纯水的粘度温度系数近乎相同时,式(5-4)中 $\frac{\eta_{T,\text{sol.},W}}{\eta_{20,W}}$ 项可分为两项 $\left(\frac{\eta_{T,\text{solv.}}}{\eta_{T,W}} \right) \left(\frac{\eta_{T,W}}{\eta_{20,W}} \right)$, 因此

$$s_{20,W} = S_{\text{显示}} \left(\frac{\eta_{T,\text{solv.}}}{\eta_{T,W}} \right) \left(\frac{\eta_{T,W}}{\eta_{20,W}} \right) \frac{(1 - \bar{V}\rho)_{20,W}}{(1 - \bar{V}\rho)_{T,\text{solv.}}} \quad (5-5)$$

【例】样品: 牛血清白蛋白, 5mg/ml

溶剂: $8M$ 盐酸胍, $\text{pH}7.0$

温度: 21.2°C

表 5-3 (a) 转速与 ω^2 , $\frac{2.303}{60\omega^2}$ 的换算(机械转速 Spinco E 型离心机)

转速 (rpm)	ω^2	$\frac{2.303}{60\omega^2}$	转速 (rpm)	ω^2	$\frac{2.303}{60\omega^2}$
1697	4.241×10^4	9.050×10^{-7}	12,590	1.738×10^6	2.208×10^{-9}
2095	4.811	7.978	13,410	1.971	1.947
2333	5.466	7.022	14,290	2.238	1.705
2378	6.199	6.192	15,220	2.539	1.512
2531	7.022	5.466	16,200	2.877	1.334
2695	7.962	4.821	17,250	3.262	1.177
2806	8.649	4.438	17,980	3.544	1.083
2994	9.826	3.906	19,160	4.024	9.539×10^{-9}
3189	1.115×10^5	3.442	20,410	4.566	8.406
3397	1.265	3.034	21,740	5.181	7.408
3617	1.434	2.677	23,150	5.875	6.533
3848	1.623	2.365	24,640	6.650	5.772
4059	1.806	2.125	25,980	7.399	5.188
4327	2.052	1.871	27,690	8.405	4.567
4609	2.329	1.648	29500	9.540	4.023
4908	2.641	1.453	31410	1.082×10^7	3.547
5227	2.995	1.282	33450	1.227	3.128
5563	3.392	1.132	35600	1.389	2.763
5784	3.662	1.048	37020	1.502	2.555
6166	4.168	9.209×10^{-8}	39460	1.707	2.249
6569	4.730	8.115	42040	1.937	1.982
6995	5.364	7.156	44770	2.197	1.747
7447	6.079	6.314	47660	2.490	1.541
7928	6.890	5.571	50740	2.822	1.360
8225	7.416	5.176	52640	3.038	1.263
8766	8.424	4.556	56100	3.450	1.113
9341	9.565	4.013	59780	3.918	9.797×10^{-10}
9945	1.084×10^6	3.541	63650	4.441	8.643
10,589	1.229	3.123	67770	5.035	7.623
11,272	1.393	2.755	72140	5.705	6.728

$S_{显示} = 0.796S$

$$\eta_{21.2, solv.} / \eta_{21.2, W} = 1.738 \text{ (图 10-3)}$$

$$\eta_{21.2, W} / \eta_{20, W} = 0.971 \text{ (表 10-3)}$$

$$\bar{V}_{20, W} = \bar{V}_{21.2, solv.} = 0.75$$

$$\rho_{20, W} = 0.998 \text{ (表 10-1)}$$

$$\rho_{21.2, solv.} = 1.151 \text{ (图 10-1)}$$

$$\therefore S_{20, W} = 0.796 \times 1.738 \times 0.971 \times \frac{(1 - 0.75 \times 0.998)}{(1 - 0.75 \times 1.151)} = 2.46S$$

(3) 沉降系数的浓度依存性: 高分子的沉降系数一般是在样品浓度高时减小, 这种倾向, 分子量大的分子较分子量小的分子明显, 常用下列经验式表示:

$$\frac{1}{S_c} = \left(\frac{1}{S^0} \right) (1 + K_s C) \quad (5-6)$$

表 5-3 (b) 转速与 ω^2 , $\frac{2.303}{60\omega^2}$ 的换算(电子控速 Spinco E 型离心机)

转速 (rpm)	ω^2	$\frac{2.303}{60\omega^2}$	转速 (rpm)	ω^2	$\frac{2.303}{60\omega^2}$
800	7.016×10^3	5.471×10^{-6}	8000	7.016×10^5	5.471×10^{-8}
900	8.879	4.323	9000	8.879	4.323
1000	1.097×10^4	3.499	10000	1.097×10^6	3.499
1100	1.327	2.892	11000	1.327	2.892
1200	1.574	2.431	12000	1.579	2.431
1300	1.853	2.071	13000	1.853	2.071
1400	2.149	1.786	14000	2.149	1.786
1500	2.467	1.556	15000	2.467	1.556
1600	2.857	1.367	16000	2.807	1.367
1700	3.168	1.212	17000	3.168	1.212
1800	3.553	1.080	18000	3.553	1.080
2000	4.387	8.749×10^{-7}	20000	4.387	8.709×10^{-9}
2200	5.308	7.231	22000	5.308	7.231
2400	6.317	6.076	24000	6.317	6.076
2600	7.411	5.179	26000	7.411	5.179
2800	8.598	4.464	28000	8.598	4.464
3000	9.870	3.889	30000	9.870	3.889
3200	1.123×10^4	3.418	32000	1.123×10^7	3.418
3400	1.268	3.027	34000	1.268	3.027
3600	1.421	2.701	36000	1.421	2.701
4000	1.755	2.189	40000	1.755	2.187
4400	2.123	1.808	44000	2.123	1.808
4800	2.527	1.519	48000	2.527	1.519
5200	2.965	1.295	52000	2.965	1.295 (—)
5600	3.439	1.116	56000	3.439	1.116
6000	3.948	9.722×10^{-8}	60000	3.948	9.722×10^{-10}
6400	4.490	8.545	64000	4.490	8.545
6800	5.071	7.569	68000	5.071	7.569
7200	5.685	6.752	72000	5.688	6.752

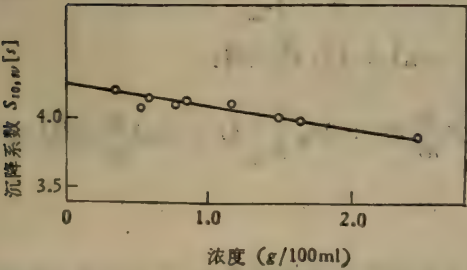


图 5-3 牛血清白蛋白 $S_{20,w}$ 对浓度 c 作图

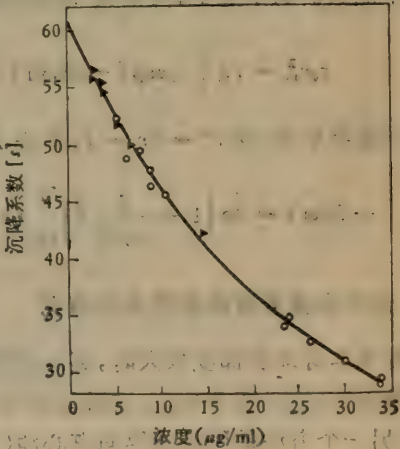


图 5-4 *P. mirabilis* DNA 沉降系数的浓度依存性

浓度依存性小的样品也可用下式表示:

$$S_c = S^0(1 - K_S c) \quad (5-7)$$

其中 S_c , S^0 分别为浓度 c 和无限稀释时的沉降系数, K_S 是常数。

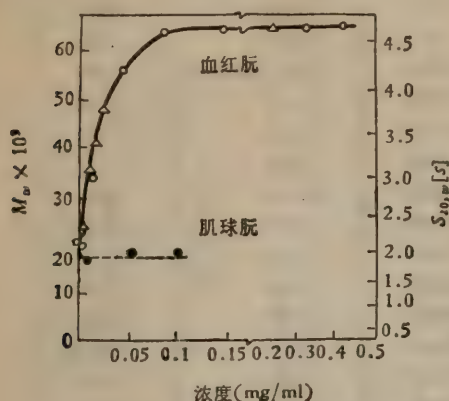


图 5-5 血红蛋白沉降系数对浓度作图

S 值在高浓度范围内不变化而在低浓度范围内降低, 溶质是一个解离聚合体系的可能性很大。图 5-5 是血红蛋白沉降系数对浓度作的图, 显示了血红蛋白在低浓度时解聚。

二、特殊情况沉降系数的测定

(一) 小 S 值

低浓度, 小 S 值 ($S < 1S$), 高扩散系数的溶质, 离心时界面刚离开液面时即扩散, 很难读出峰的最高值的位置。这时可用合成界面离心池做实验, 在离心过程中溶剂流向溶液表面, 人为地形成界面, 按照上述同样方法从界面移动的速度求 S 值, 不过溶剂必须是样品透析平衡的外透液。

不能透析的小分子, 可根据 Baldwin 的处理^[14]用下式计算:

$$c_0 r_m^2 = r_m^2 \left[c_0 \exp(-2S\omega^2 t) - \int_{r_m}^{r_i} (dc/dr) dr \right] + \int_{r_m}^{r_i} r^2 (dc/dr) dr \quad (5-8)$$

为便于数字积分, 令 $r^2 = (r - r_m)^2 + 2r_m(r - r_m) + r_m^2$, 代入得:

$$-2S\omega^2 t = \ln \left[1 - \frac{1}{c_0 r_m^2} \left\{ \int_{r_m}^{r_i} (r - r_m)^2 \frac{dc}{dr} dr + 2r_m \int_{r_m}^{r_i} (r - r_m) \frac{dc}{dr} dr \right\} \right] \quad (5-9)$$

(二) 溶剂本身浓度梯度很大的情况

溶剂本身浓度梯度很大时, 离心过程中会和溶质的浓度梯度重合, 因此无法判断溶质最高峰值的位置(图 5-6)。这时应该用双槽离心池用浓度分布的二次矩的平方根来求 S 值。另一个方法是用合成界面离心池(图 5-7), 调节溶剂数量使合成的界面位于相对来讲浓度梯度不大的离心池中央部位。

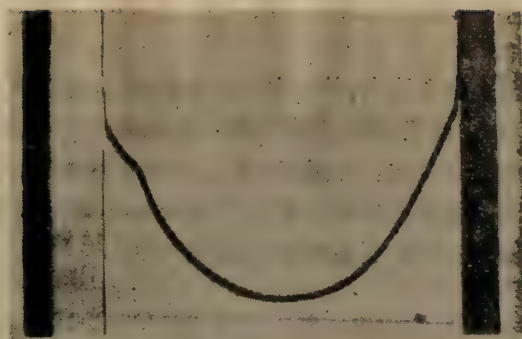


图 5-6 用标准池芯的情况

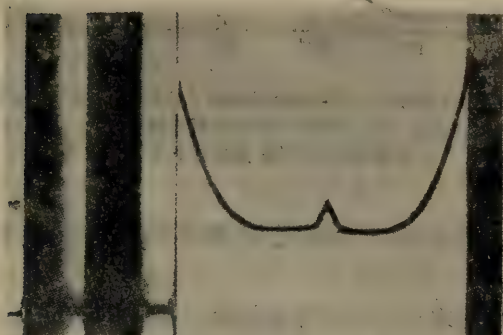


图 5-7 用合成界面池的情况

(三) 大分子 DNA 的沉降系数

Rosenbloom 等^[15]报道了从噬菌体 T3, T4, T5, T7 制备的 DNA 沉降系数为 30—50S, 分子量范围 $2-8 \times 10^7$ 。沉降过程中一部分似聚合, 余下部分的单体浓度决定于分子的大小和转速(图 5-8)。因此应在不引起聚合的低浓度和低转速进行测定。

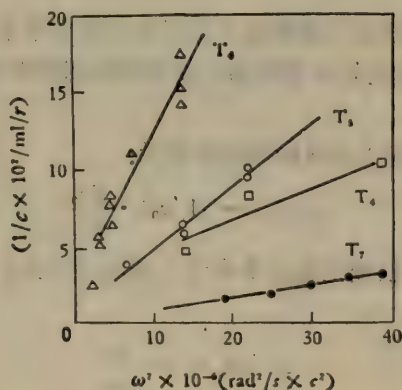


图 5-8 DNA 单体浓度和转速的关系。

T7DNA (分子量 25000000, 31S), T5DNA (分子量 84000000, 48.5S), T4DNA (半分子量)(分子量 65000000, 41.5S), 在 0.05M 磷酸缓冲液, pH7.2, 0.2MNaCl。

(四) 差别沉降法

把两个样品分装于两个离心池内,其中之一用楔形窗,离心过程中同时摄影,测定 S 值,这个方法叫示差沉降法。这里讲的差别沉降法,是指测定同一样品由于环境变化引起结构改变产生的极微小的 S 值变化。把两部分样品分放在双槽离心池的两个槽中,用干涉光学系统观察它们之间 S 值存在的微小差别。Kirschner 等^[16]用差别沉降法观察天冬氨酸转氨甲脒酶 (ATCase) 的催化亚基的结果,见图 5-9。

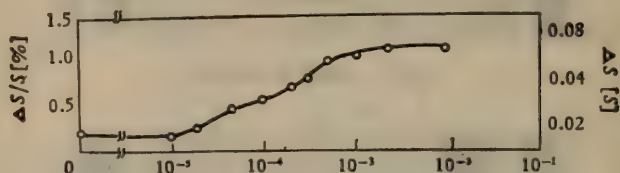


图 5-9 差别沉降法观察天冬氨酸转氨甲脒酶 (ATCase) 催化亚基的结果。
槽 1: ATCase 催化亚基 $2 \times 10^{-3} \text{M}$ 氨甲酰磷酸锂+琥珀酸盐; 槽 2: ATCase
催化亚基 $2 \times 10^{-3} \text{M}$ 磷酸钾+戊二酸。

三、样品均一性的鉴定和不均一性的分析

沉降速率法实验的目的之一是研究样品的均一性。在 Schlieren 图谱上,理论上讲均一的物质应是单一对称的峰。但是影响峰形的因素很多,样品不均一性会使界面变宽, S 的浓度依存性产生界面陡峭效应,溶质的扩散、Johnston-Ogston 效应均影响峰形。如果说溶质均一是单一峰,那末单一峰不一定均一,非对称峰也不一定不均一。简单的从 Schlieren 峰的对称性判断溶质是否均一是危险的。配合其他分析方法,如沉降平衡、凝胶过滤、盘状电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳等平行实验来判断比较好。

(一) 多分散体系的分析

对于一些系统,超离心机的分辨能力不足以分离各个单个组分,结果得到一系列连续分布的沉降系数。从不同的起始浓度样品溶液得到的沉降图谱可以计算沉降系数的分布函数 $g(S)$ 。

沉降系数 S_0 的分布常用其重量频率函数表示:

$$g_0(S_0) = (1/c_0) \cdot \frac{dc_0}{dS_0} \quad (5-10)$$

其中 c_0 是总浓度。假定界面变宽完全是由于 S_0 的分布 (无扩散,无浓度效应, $S = S_0$), 则:

$$dc/dc_0 = \omega^2 r t \frac{dc}{dr} \quad (5-11)$$

对离心池液槽的扇形切面作校正 $\left(dc_0 = \left(\frac{r}{r_m} \right)^2 dc \right)$ 后,得

$$g_0(S_0) = \left(\frac{1}{c_0} \right) \left(\frac{r}{r_m} \right)^2 \omega^2 r t \frac{dc}{dr} \quad (5-12)$$

实际上扩散是不可避免的,所以上述 $g_0(S_0)$ 只是显示的频率函数,定为 $g^*(S)$,

$$S = \left(\frac{1}{\omega^2 t} \right) \ln \left(\frac{r}{r_m} \right)。$$

这里 S 只是表示离心池中一个位置,而不是样品中某一组分的沉降系数。因此用 S 表示而不用 S 来表示。

由于扩散使界面变宽,是与 $t^{\frac{1}{2}}$ 成比例,而沉降系数不均一使界面变宽与 rt 成比例,外延至 $t \rightarrow 0$ 时将可去除扩散的影响。做完一次实验后,在不同时间 t 计算 $g^*(S)$ 曲线,然后将这一组曲线以 $g^*(S)$ 或 $[g^*(S)]^{-2}$ 对 $1/t$ 作图,外延至零时,得到一系列 S 值。

另一个 $g(S)$ 曲线要校正的是 Johnston-Ogston 效应。最方便的方法是在稀溶液进行实验,这时 Johnston-Ogston 效应可以忽略。用高灵敏度的光吸收法或干涉光系统来做实验是完全可以做到的。对于巨大分子扩散也可忽略,则可直接用式 (5-12) 计算(图 5-10)。为了简化起见,离心池中粘度、密度和压力均未校正,如有必要的话,可按常规方法进行。

(二) 多组分体系的分析

多组分体系在 Schlieren 图谱上出现二个以上的峰。各组分之间如有相互作用将使情况复杂化。体系中 α 组分的沉降系数 S_α 不仅取决组分 α 的浓度,还取决于 $\beta, \gamma \dots$ 等组分。相互作用使得这个系统很难进行数学处理。有实际意义的就是前面提到的 Johnston-Ogston 效应。单用平方根稀释定则校正,峰面积之比仍不能正确代表各组分浓

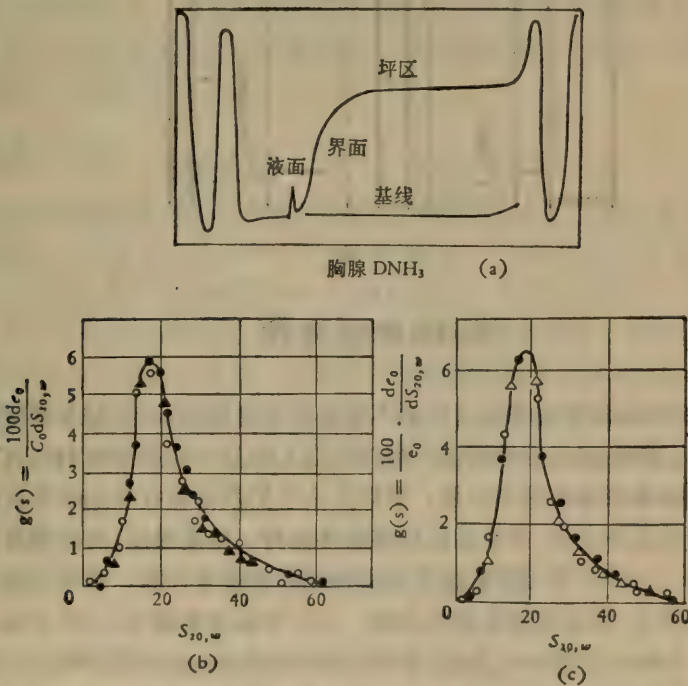


图 5-10 (a) 小牛胸腺 DNA 的光吸收沉降曲线 (0.004% 在 0.2M NaCl, pH7 中), 57980rpm。 (b) DNA 样品的沉降系数分布 (不同时间) \circ 4.7 分; \triangle 10.7 分; \blacktriangle 16.7 分。 (c) DNA 样品的沉降系数分布 (不同转速) \bullet 59780; \triangle 42040; \circ 20410。 [Schumaker, V. N 和 H. K. Schächman (1957) *Biochim Biophys.*

Acta 23: 628-639]

度之比,慢组分的可以出现应有面积的 3—4 倍,必须予以注意。

(三) 解离聚合体系

Gilbert^[17,18] 给出了同一分子解离聚合体系 and 不同分子解离聚合体系形成界面的形状。可逆解离聚合体系中,如果反应速度很快,多聚体少时将观察不到这个峰。例如血红蛋白在 0.002mg/ml 浓度时 S 是 2.0S (图 5-5)。大于这个浓度,沉降速度变大,0.25mg/ml 时, S 是 4.6S。在这两个浓度范围内,界面呈现一平均的沉降常数。多聚体多时,将可观察到单体和多聚体各自的界面。但是单体和多聚体之间平衡常数因压力而变化,图 5-11 是肌球蛋白的单体 ($S_{20,w}^0 = 6.5S$) 和多聚体 ($S_{20,w}^0 = 150S$) 之间平衡与压力的关系^[19]。

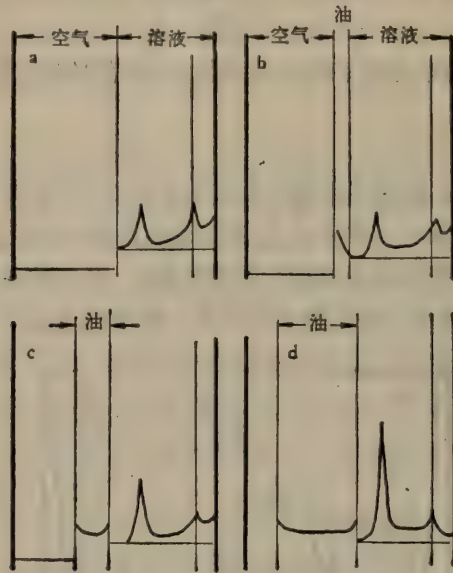


图 5-11

四、区带沉降法

和沉降速率法不同,区带沉降法中样品不是溶解在溶剂内,而是铺在密度较样品溶液密度大的溶剂上面,样品成区带状沉降。溶剂中溶入小分子物质使溶剂具有“自生”密度梯度性质。小量样品溶液铺在溶剂上面,交界处由于扩散很快在样品区带前面形成一密度增加区。只要条件选择合适,在样品区带前始终保持一密度梯度,沉降物质以基本不变的组成呈区带沉降。沉降系数可以从区带中心移动的速度来计算,和移动界面法类似。

和移动界面法相比,区带沉降法的优点是: (1) 样品需要量少; (2) 不同 S 的组分可以完全分开,没有 Johnston-Ogston 效应,各组分间相对浓度完全可以测定; (3) 样品不需要透析(事实上也不允许透析)。因此要研究不同沉降介质的影响,譬如说研究 pH 的影响,只要改变溶剂的 pH 就可以了。不过溶质用量很少,一般检测用的折射率法灵敏度不够,需要用光吸收法检测,这就带来了一定的局限性。另外,操作也需要一些技巧,特别是不知道样品密度和沉降系数时。如果沉降溶剂和样品薄层之间的密度差不足时,扩散梯度

不足以支撑样品溶质,产生混和;如果密度差过分大,将观察不到样品区带,因为过分陡峭的扩散梯度使光偏离光学系统。样品区带沉降过快,会走出扩散梯度区进入纯溶剂区,这时区带不稳定而与溶剂混和。区带沉降法适宜于做扩散慢的分子,如核酸和病毒等的工作。大分子量蛋白质测定效果不及它们好,因为区带扩散太快。

(一) 样品、实验条件

样品浓度: 天然 DNA、病毒粒子等为 $0.05-0.1\text{mg/ml}$ 。扩散快的样品浓度要更高一些。区带中心浓度保持在 0.5 O. D. , 样品溶液用量 $10-20\mu\text{l}$ 。

沉降溶剂: 在 $0.5-4\text{M NaCl}$ 或 CsCl 中选用,通常用 0.5M KCl , 1.0M NaCl 。低离子强度实验可改用 $50-90\%\text{D}_2\text{O}$ 或蔗糖溶液。不过蔗糖溶液的扩散系数较其他盐溶液为小,由扩散产生密度梯度比较难。

离心池: 根据实验目的选用区带沉降离心池 I 型、II 型或 III 型(图 3-6)。如果没有这些特殊规格池芯,也可用合成界面离心池。

运转条件: 一般选 $30,000\text{rpm}$, 20°C 进行实验。紫外摄影两次间隔 8 分钟,直至全部区带沉降到离心池底为止。离心开始时如在样品区带部位有一暗区,表明盐梯度足够陡峭,使光偏离光学系统。如果这个暗区在以后几张底片中不消失,实验应重做,选一密度较低的沉降溶剂或者在样品溶液中加入盐。如既不出现样品区带也不出现暗区,则应改用更高密度的沉降溶剂(更浓的 NaCl 或者加 CsCl 、蔗糖)。如果离心开始时有样品区带,以后消失,那就要降低转速。快速扩散的区带表示样品可能是多分散体系;不对称区带可能是多分散体系,也可能是存在浓度依存关系。判别的方法是用更低浓度再试一次,如果区带变得对称起来,是浓度依存关系。

(二) 沉降速度的计算

在光电扫描记录的图谱或光密度计扫描底片的图谱上,选择区带的最高点测量区带至轴心的距离 r 。和常规方法一样,以 $\log r$ 对时间 t 作图,计算沉降系数 $S_{\text{显示}}$, 换算成标准状态 $S_{20,w}$ 。再从一系列浓度测定的 $S_{20,w}$ 值对浓度 c 作图,外延至 $c \rightarrow 0$ 得 $S_{20,w}^0$ 。样品中如有几个组分,可以分别测定每一峰下的面积和最高点的位置。从峰的面积可计算各组分的浓度(假定各组分消光系数是一样的)。如果各组分消光系数不同但均已知,可把各峰的面积以各自的消光系数除之计算各组分的浓度。从各峰的最高点可计算各组分的沉降系数。Vinograd 等^[20]用本法和常用的移动界面法测定沉降系数比较,所得结果基本一致。

五、沉降系数和分子量

一部分实际测定的沉降系数和分子量、分子形状之间的关系见表 5-4。

六、从沉降系数计算 DNA 分子量

超离心分析测定分子量的范围很广(10^2-10^6),但是对某些巨大分子,如 DNA 的分

表 5-4 沉降系数和分子量

样 品	$S_{20,w}^0 \times 10^3 (\text{秒})$	分 子 量	形 状	
球状蛋白质 ^{*1}				
核糖核酸酶	1.64	13,680	(一)	
溶菌酶	1.87	14,100		
糜蛋白酶原	2.54	23,200		
β -乳球蛋白	2.83	35,000		
卵白蛋白	3.55	45,000		
血清白蛋白	4.31	65,000		
血红蛋白	4.54	68,000		
过氧化氢酶	11.3	250,000		
脲酶	18.6	480,000		
纤维状、棒状蛋白质				
弹性硬阮	0.71	6,830	(二)	
细胞色素 b ₅	1.31	14,750		
原肌球蛋白	2.59	72,000		$\phi 20 \text{ \AA} \times 490 \text{ \AA}$
胶原	3.0	280,000		$\phi 15 \text{ \AA} \times 3000 \text{ \AA}$
肌球蛋白	5.5	596,000		$\phi 20 \text{ \AA} \times 1500 \text{ \AA}$
丝纤阮	22.3	1,200,000		
纤维蛋白原	7.63	339,700		
无规线团蛋白质 ^{*2}				
核糖核酸酶	1.36	13,680	(二)	
血红蛋白	1.04	15,500		
肌红阮	1.06	17,200		
β -乳球蛋白	1.40	18,400		
糜蛋白酶原	1.5	25,700		
醛缩酶	1.7	40,000		
免疫球蛋白	1.7	40,000		
血清白蛋白	2.4	69,000		
肌球蛋白	4.3	197,000		
巨大分子噬菌体, 病毒				
噬菌体 fd	40	11.8×10^4	$\phi 50 \text{ \AA} \times 7600 \text{ \AA}$	
蕃茄丛矮病毒	132	10.6×10^4	$\phi 170 \text{ \AA} \times 2800 \text{ \AA}$	
烟草花叶病毒	185	31.3×10^4		
T7 噬菌体	487	37.5×10^4		
			头 $\phi 470 \text{ \AA} \times 420 \text{ \AA}$ 尾 $\phi 100 \text{ \AA} \times 150 \text{ \AA}$	

*¹ C. Tanford Physical Chemistry of Macromolecules, Wiley, N. Y. 1971.*² 在 6M 盐酸胍, 0.1M β -巯基乙醇中测定 [C. Tanford, K. Kawahara & S. Lapanje J. Am. Chem. Soc. 89, 729 1967].

子量测定仍有困难。然而沉降系数与分子量有关,对同一构型的 DNA 可通过经验式由沉降系数来计算分子量。

(一) 线型双链 DNA (NaDNA)

最佳经验式是

$$S_{20,w}^0 = 2.8 + 0.00834M^{0.479} \quad (M > 10^6) \tag{5-13}$$

根据式 (5-13) 计算的 DNA 分子量列表 5-5 中。

表 5-5 线型双链 DNA 的沉降系数和分子量

DNA 来源	沉降系数 ($S_{20,w}^0$)	$M \times 10^{-6}$
$\phi \times 174$ RF II	14.3	3.4
T7	32.0	25.2
T5+	51.8	67.9
T4	61.8	108

分子量小于 10^6 , M_w 可按下式计算。由于没有比较好的标准 DNA 样品, $S_{20,w}^0$ 与 M 的关系式 (5-14) 不如式 (5-13) 那样精确。

$$S_{20,w}^0 = 0.116M^{0.325} \quad (3 \times 10^5 < M < 4 \times 10^6) \tag{5-14}$$

(二) 线型单链 DNA (NaDNA)

单链 DNA 的可弯曲度甚高,分子的沉降系数对 pH、离子强度、温度等有很大的依存性。另外,分子内形成氢键,分子的碱基组成和碱基顺序的特异性也可能影响沉降系数。因此在碱性 pH 溶液中测定较好。如果在中性 pH 附近测定,样品溶液测定前要加热处理 (90℃, 5 分钟),急冷备用。分子量 $> 10^6$, 按下式计算:

$$S_{20,w}^0 = 0.0461M^{0.408} \quad (M > 10^6) \tag{5-15}$$

(碱性 DNA, 0.9M NaCl, 0.1M NaOH, $R = 1.160$, $T = 20-25^\circ\text{C}$)

其中 $R = \frac{\eta_{\text{溶剂}}}{\eta_w} \frac{(1 - \bar{V}\rho)_{20,w}}{(1 - \bar{V}\rho)_{T,\text{溶剂}}}$

$$S_{20,w}^0 = 0.00929M^{0.557} \quad (M > 10^6) \tag{5-16}$$

(中性 DNA, 1.0M NaCl, 0.01M Tris-HCl 缓冲液, pH8, $R = 1.144$, $T = 20-25^\circ\text{C}$)

表 5-6 线型单链 DNA 的沉降系数和分子量

DNA 来源	$M \times 10^{-6}$		$S_{20,w}^0$		
	单链	双链	双链	单链(碱性)	单链(中性)
$\phi \times 174$	1.70	—	—	16.1	27.6
fd	1.90*1	—	—	17.0*2	—
λ . d. g (半分子)	9.0	(18.0)	27.7	30.7	64.7
T7	12.6	25.2	32.0	37.2	84.8
λ dg (全分子)	15.5	(31.0)	35.1	40.1	95.8
T2	58	(116)	63.5	72.7	208

括号内的分子量是以双链 DNA $S_{20,w}^0$ 值,由式 (5-13) 计算。

*1 S. A. Berkowitz & L. A. Day *Biochemistry* **22**, 4825 (1974).

*2 Y. Ikehara, Y. Obata, H. Utiyama & M. Kurata *Bull. Ind. Chem. Res. Kyoto, Univ.* **51**, 140 (1973).

用 Studier 的 $S_{20,w}^0$ 数据^[21],按式 (5-16)、(5-17) 两边取对数,用最小二乘法计算的结果见表 5-6。

分子量 $< 10^6$ 的单链线型 DNA 分子量的计算,和上述双链 DNA 情况相似,也是没有合适的单分散样品,较好的经验式如下:

$$S_{20,w}^0 = 0.056M_w^{0.36} \quad (M < 10^6) \quad (5-17)$$

(三) 环状双链 DNA

体内环状双链 DNA 螺旋之间间距较线型双链 DNA 为长,因为在水溶液中蓄积内能。为了减少这种倾斜,双链间形成超螺旋结构,这种 DNA 叫 I 型。如果环状 DNA 中有一条链断开,螺距回到正常值,分子整体来讲不倾斜,称做 II 型。

I 型、II 型环状 DNA 分子量和沉降系数的关系如下:

$$S_{20,w}^0 = 0.0139M^{0.485} \quad (\text{I 型 DNA}) \quad (5-18)$$

$$S_{20,w}^0 = 2.97 + 0.00947M^{0.479} \quad (\text{II 型 DNA}) \quad (5-19)$$

用式 (5-18) (5-19) 计算的一些 DNA 分子量见表 5-7^[22]。

表 5-7 环状 N_e DNA 的沉降系数和分子量

DNA 来源	$S_{20,w}^0$			$M \times 10^{-6}$
	I 型	II 型	线型 (III 型)	
SV40	21.0	16.0	14.0	3.40
$\phi \times 174\text{RF}$	21.0	16.3	14.3	3.59
	20.3	15.8	14.4	3.66
	28.2	20.2	18.0	6.43
	39.0	27.0	24.0	12.9
线粒体	38.9	27.6	24.7	13.8
细胞内 λ cb 265	53.7	35.8	31.7	24.6
细胞内 P22	60	40	35.2	21.2

III 型 DNA 分子量是按式 (5-13) 计算。

第六章 沉降-扩散法测定分子量

高分子的研究首先遇到分子量测定问题,分析超离心机使用方便,对分子量测定特别有用。沉降分析测定分子量范围很广,小自蔗糖,大至粒子量为 50×10^6 的病毒;多分散体系可以得到平均分子量,分子量分布。沉降分析测定时不需要知道溶质的形状和溶剂化情况。得到的分子量是“绝对”的,不需要用已知分子量的标准物质来校正。

沉降-扩散法和沉降平衡法是最常用的两种沉降分析测定分子量方法。过去大量应用沉降-扩散法测定分子量,现在虽然比较少用,但仍不失其应用价值。和沉降平衡法(见第七章)比较,本法的优点是,对寡组分体系样品可以利用各组分沉降速度不同而相互分离,分别测定它们的分子量(如有扩散的数据提供)。在某些特殊情况下,分子大小相似,形状不同,或者形状相同、大小不一,只要能利用沉降速度不同而分开,也可以分别测定分子量。一些分子量很大的分子,如 DNA,不适用沉降平衡法测定,沉降-扩散法可以测定。这类分子通常也基于沉降系数来计算分子量(第五章第 6 节)。

一、沉降-扩散法原理

当离心力很大时,高分子溶质沉降。高分子溶质受两个力作用:离心力和移动时溶剂的阻力。当这两种力平衡时,高分子的沉降恒稳速度 dr/dt 满足下式:

$$M(1 - \bar{V}\rho)\omega^2 r = f \cdot \frac{dr}{dt} \quad (6-1)$$

式中 M 是分子量, \bar{V} 是溶质的偏微比容, ρ 是溶液的密度, ω 是角速度, r 是距轴心的距离, f 是阻力系数。 f 随高分子的形状和大小、溶剂的粘度、高分子与溶剂分子间的相互作用而异。假定高分子在溶液里沉降所受到溶剂分子的阻力和高分子在溶液里扩散时所受到的阻力相同,那末

$$f = \frac{RT}{D} \quad (6-2)$$

其中 D 是扩散系数, R 是气体常数, T 是绝对温度。

单位离心力场下的沉降速度即沉降系数

$$S \equiv \frac{1}{\omega^2 r} \frac{dr}{dt} \quad (2-2)$$

所以

$$M = \frac{RT_s}{D(1 - \bar{V}\rho)} \quad (6-3)$$

这就是 Svedberg 方程式。

在相同的实验条件下测定沉降系数(见第五章)和扩散系数,以及溶质偏微比容和溶液的密度(见第十章)。从一个浓度测定的沉降系数 S 和扩散系数 D ,代入式(6-3),计

算的结果是显示分子量。当然在测定 S 和 D 时,浓度和温度等实验条件要一致。代入式(6-3)中的温度和溶液密度就是实验时的温度和溶液密度。

用 $S_{20,w}$ 和 $D_{20,w}$ 来计算时,式(6-3)中的温度是 293.2°K,密度是 20℃ 时该样品实际浓度的水溶液的密度,不过绝大多数情况下,此值用水的密度代替,已足够准确。

最好是做一系列浓度的测定(同一溶剂,同一温度),得到的 S 和 D 值外延至无限稀释($c \rightarrow 0$)。把 S° 和 D° (不需要校正到 20℃,水)以及溶剂密度,实验时的温度代入式(6-3)计算分子量。

如果计算中采用溶质偏微比容 \bar{V} 是非溶剂化的值,那末式(6-3)计算的分子量就不是溶剂化分子的分子量。

二、离心池中测定扩散系数

有许多方法测定扩散系数,以 Tiselius 电泳池自由界面实验得到的结果最好,数据精确并且重复。但是使用不是很方便,而且需要较多的样品。另一方面,生物样品例如蛋白质并不是绝对均一,用的溶剂是缓冲液或者含盐溶液可能存在一些影响,实际上也限制了扩散系数的准确性。因此利用合成界面离心池来测定扩散系数同样是可行的。在合成界面离心池内测定扩散系数样品需要量很少,离心池液槽的扇形以及离心时产生的略有弯曲的液面所引起的误差可以忽略不计。

超离心机内测定扩散系数的方法很简单。用合成界面离心池合成一个陡峭界面,界面随时间扩散,测定其扩散系数。通常在低速旋转,使粒子基本上不沉降。不过即使粒子沉降,本法仍可应用。如果粒子的扩散有显著的浓度依存,界面会出现不正常的陡峭,这样就要做一系列不同浓度的实验,外推出 D° 。

(一) 实验方法

用相对来讲浓度比较高的蛋白质溶液(2—10mg/ml) 0.15ml,放在双槽毛细管型池芯的合成界面离心池的溶液槽中,另一槽加满溶剂。温度调节至实验温度(常用 20℃),转头加速到 6,000rpm,记下观察到界面刚刚合成的时间,作为零时。到达 6,000rpm 后降低电压,但不停机,使转头自由地慢慢降速。温度控制在测定沉降速度时同样的温度。在 1—3 小时内,开始时每隔 2 分钟摄一张 Schlieren 图谱,以后可隔 4 分钟、8 分钟、16 分钟等拍摄一张。

(二) 结果计算

在分析超离心机中测定扩散系数,用 Schlieren 光学系统检测,可用拐点法,也可用高-面积法计算。

扩散界面和折射率梯度的关系是:

$$\left(\frac{\partial n}{\partial x}\right) = \frac{\Delta n}{2\sqrt{\pi Dt}} \exp \left(-\frac{x^2}{4Dt}\right) \quad (6-4)$$

其中 n 是折射率, D 是扩散系数, t 是时间, x 是距离。在 $x = 0$ 时, $\partial n / \partial x$ 有最大值

$$\left(\frac{\partial n}{\partial x}\right)_{\text{最大}} = \frac{\Delta n}{2\sqrt{\pi Dt}} \quad (6-5)$$

曲线拐点的 x 值, 只要使 $\left(\frac{\partial^2 n}{\partial x^2}\right) = 0$ 即可, 因此

$$x_i^2 = 2Dt \quad (6-6)$$

其中脚注 i 表示拐点。结合式 (6-4), (6-5), (6-6) 得:

$$\left(\frac{\partial n}{\partial x}\right)_i = \left(\frac{\partial n}{\partial x}\right)_{\text{最大}} \exp^{-\frac{1}{2}} \quad (6-7)$$

用 Schlieren 光学系统检测, 底片上的图形纵轴以 Y 表示, 横轴以 X 表示, 则

$$\frac{\partial n}{\partial x} = KY \quad (6-8)$$

$$\Delta n = \frac{K}{F} \int_{-\infty}^{\infty} Y dx = \frac{K}{F} A \quad (6-9)$$

其中 K 是仪器常数, F 是 X 轴的放大倍数, A 是峰下的面积。将式 (6-5) 与式 (6-8), (6-9) 结合

$$D = \left[\frac{A}{FY_{\text{最大}}} \right]^2 \frac{1}{4\pi t} \quad (6-10)$$

结合式 (6-7), (6-8), (6-9)

$$Y_i = Y_{\text{最大}} \exp^{-\frac{1}{2}} \quad (6-11)$$

由式 (6-11) 可从曲线求得两个 X_i 值, 结合式 (6-6) 得:

$$D = \frac{1}{2t} \left[\frac{X_i}{F} \right]^2 \quad (6-12)$$

式 (6-10) 是高-面积法计算的根据, 而式 (6-12) 是拐点法计算的根据。

[例] 酵母醛缩酶扩散系数测定 (拐点法)^[23]。 $c = 12.84\text{mg/ml}$ 。以 x_i 对时间 (以秒为

编号	时间(分)	$Y_{\text{最大}}$	$\frac{Y_{\text{最大}}}{\sqrt{c}}$	X_i	F	$x_i (\times 10^3)$	$x_i^2 (\times 10^3)$
1	4	1.695	1.028	0.080	2.1733	3.68	1.35
3	8	1.725	1.046	0.085	2.1733	3.91	1.53
5	12	1.625	0.992	0.090	2.1733	4.40	1.62
7	16	1.510	0.916	0.102	2.1733	4.67	2.18
9	20	1.385	0.840	0.103	2.1733	4.72	2.23
11	24	1.300	0.789	0.107	2.1733	4.90	2.40
13	28	1.235	0.749	0.120	2.1733	5.52	3.05
15	32	1.210	0.734	0.123	2.1733	5.64	3.18
17	36	1.150	0.698	0.128	2.1733	5.87	3.45
19	40	1.112	0.675	0.134	2.1733	6.18	3.82
21	44	1.067	0.648	0.138	2.1733	6.33	4.00
23	48	1.035	0.628	0.143	2.1733	6.59	4.34

单位) 作图, 用最小二乘法得

$$x_i^2 = 11.60 \pm 0.27 \times 10^{-7} t + 0.94 \pm 0.05 \times 10^{-7}$$

$$D_{\text{显示}} = 5.80 \pm 0.13 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{秒}$$

高-面积法的计算：测量 Schlieren 峰下的面积 A ，峰高 (Y_{max})，以 A^2/Y_{max}^3 对时间 t (单位：秒) 作图，所得直线的斜率除以 $12.566 (4\pi)$ ，得到显示扩散系数。

如要测定无限稀释时溶液的扩散系数 D_0 ，可做一系列不同浓度的实验，外延至零浓度。测定 $D_{20,w}$ ，可利用下式

$$D_{20,w} = D_{\text{显示}} \left(\frac{293.2}{T} \right) \left(\frac{\eta_t}{\eta_{20}} \right) \left(\frac{\eta_{\text{溶剂}}}{\eta_w} \right) \quad (6-13)$$

用其他光学方法检测计算扩散系数，干涉光系统有较高精度，但是必须假定界面的形状是 Gaussian 分布。低浓度样品可用光吸收法测定。

第七章 沉降平衡法

使用较低转速,在较小离心力场中,由于高分子的离心沉降(产生浓度梯度)和扩散(减小浓度梯度)两种相反的作用达成平衡,离转轴不同距离处的浓度分布就达到一恒稳值,不再改变(图 2-6)。沉降平衡法就是利用沉降平衡时离心池中溶质的浓度分布来计算溶质的分子量。在超离心沉降分析发展的历史过程中,最先应用的技术就是沉降平衡法。限于早期实验条件的困难,不久就很少应用,有一段时间几乎完全为沉降-扩散法取代而不再应用。以后由于超离心机性能改进,特别是光学检测系统的改进,沉降平衡实验变得好做了,加上理论基础比较完善,实验方法的发展,测定的分子量数据比较正确,因此近年来沉降平衡法测定分子量又再度崛起,占了绝对优势。

沉降平衡法测定分子量有两种主要的实验方法,即低速沉降平衡法和高速沉降平衡法。它们的优缺点见表 7-1。另外还有超短液柱沉降平衡法,它可缩短离心时间。

表 7-1 低速沉降平衡法和高速沉降平衡法的比较

特 征	低速平衡法	高速平衡法
液底浓度和液面浓度之比, C_b/C_m	3—10	1000—20,000
起始浓度	2—20mg/ml	0.1—2mg/ml
测定起始浓度	要	不要
到达平衡需要的时间	长	短
离心池液槽形状	扇形	不是扇形亦可
数据精确度	高	低
允许测定的浓度范围	狭	宽
由浓度分布得到的分子量	M_w, M_z^*	M_n, M_w, M_z^*

* M_n, M_w, M_z 分别是数均分子量,重均分子量,Z 均分子量,即

$$M_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} = \frac{\sum C_i}{\sum C_i / M_i}$$

$$M_w = \frac{\sum W_i M_i}{\sum W_i} = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} = \frac{\sum C_i M_i}{\sum C_i}$$

$$M_z = \frac{\sum (W_i M_i) M_i}{\sum W_i M_i} = \frac{\sum n_i M_i^3}{\sum n_i M_i^2} = \frac{\sum C_i M_i^2}{\sum C_i M_i}$$

其中 M_i 为 i 分子的分子量。

一、低速沉降平衡法测定分子量

所谓低速沉降平衡法的“低速”是和高速沉降平衡法相对而言的。低速沉降平衡法就是传统的沉降平衡法。

理想溶液或近似理想溶液达到沉降平衡状态时,距转轴轴心 r 处所有分子的总浓度

和重均分子量 $M_w(r)$ 有下列关系:

$$M_w(r) = \frac{2RT}{(1 - \bar{V}\rho)\omega^2} \frac{d \ln C}{dr^2} \quad (7-1)$$

其中 \bar{V} 是溶质的偏微比容 (ml/g); ρ 是溶液的密度, 在稀溶液时以溶剂的密度 ρ_0 代之; R 是气体常数 (8.313×10^7 尔格/度·克分子); T 是绝对温度 (°K); ω 是角速度 (弧度/秒), 即转速 (rpm) $\times \frac{2\pi}{60}$ 。因此在计算分子量时, 要知道沉降平衡时离心池中各处的溶质浓度、转速、温度、偏微比容和溶液的密度。

低速沉降平衡法液面溶质浓度不能为零, 要知道离心池中溶质浓度的分布, 需要用其他方法测定起始浓度 C_0 , 然后用下列条件式计算

$$\int_{r_m}^{r_b} r \cdot C dr = \frac{C_0}{2} (r_b^2 - r_m^2) \quad (7-2)$$

其中 r_m , r_b 分别是轴心至液面和液底的距离。

(一) 实验方法

1. 样品配制 沉降平衡实验每次测定时间很长, 费用也较贵, 因此样品最好用其他方法测定其均一性, 并且初步估算它的分子量。样品对溶剂充分透析 (过长或更长时间), 如有杂质先用制备超离心机离心除去。

溶质浓度: 在 0.5—5.0mg/ml 浓度范围内测定三个浓度。如用光电扫描装置检测, 蛋白质浓度为 0.05—1.0mg/ml, 核酸浓度为 0.01—0.1mg/ml。

溶剂: 同沉降速率法实验, 务必使电荷效应减至最少。缓冲液离子强度在 0.1—0.2 之间。透析平衡后的外透液应仔细保存, 保持浓度不变。

2. 光学系统 如果用光电扫描装置, 离心池中溶质的绝对浓度可以直接测定, 不需要另外再测定起始浓度。所得分子量精确度甚高, 只是目前这个装置还不普遍。用摄影记录光吸收法, 虽然早年 Svedberg 曾应用过, 但是定量困难, 一般不能满足要求, 实际上早已停用。最常用的是干涉光学系统。干涉光学系统虽然两点间浓度差测定误差可小于

1%, 但是要另做实验测定起始浓度, 并且液面和液底的浓度读数困难, 容易引进误差。Schlieren 光学系统精度较低, 但是比起干涉光学系统, 它不需要作浓度校正。有些计算方法不需要另做实验测定起始浓度, 不需要测量液柱两端的图象。特别是它可以在较高样品浓度和较高盐浓度下测定, 可用于高浓度的盐酸胍和脲溶液中测定溶质的分子量^[24]。

3. 离心池 选用双槽离心池。转速在 20,000rpm 以上时, 用石英窗光线会产生偏折, 宜用宝石窗。离心池的双槽 (如图 7-1 所示) 一侧装溶液, 一侧装溶剂, 有固定位置不能搞错 (至于哪一侧液槽盛溶液, 哪一侧液槽盛溶剂, 请参阅离心机说明书。Beckman 公司

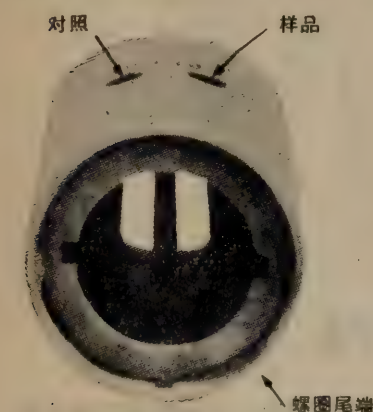


图 7-1 离心池双槽

Spinco E 型分析超离心机是左侧为溶液槽)。为了使液底明显, 在溶液槽中另加密度较样

品溶液密度高但和样品溶液不互溶的底液。常用的底液有 FC43 (氟油), 硅油或四氯化碳。不过测定蛋白质时要注意防止底液与样品溶液接触处界面蛋白质变性。一次实验溶液用量为:

- 溶液槽: 溶液 0.11ml
底液 0.01—0.02ml

溶剂槽: 外透液 0.13—0.14ml (必须比溶液槽多)

4. 转头 低速旋转, 转头的振动将影响精度。12000rpm 以下宜用 An-J 转头, 高速时用 An-H 或 An-D 转头。

5. 转速 沉降平衡后, 液面和液底浓度差越大, 分子量测定精度越高。转速过高将使液底的浓度变化 (dC/dr) 变得很大, 以致光线偏离光轴。通常取 $C_b/C_m = 3$, 这时转速转为合适 (C_b, C_m 分别是液底和液面的浓度)。

C_b/C_m 与转速的关系如下式, 这是将式 (7-1) 自 r_m 至 r_b 积分:

$$\ln\left(\frac{C_b}{C_m}\right) = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)}{2RT} \omega^2(r_b^2 - r_m^2) = \frac{1}{\alpha} \tag{7-3}$$

由式 (7-3) 计算 3mm 液柱时, 各 C_b/C_m 值与分子量和转速的关系列表 7-2 中, 设 $T = 283^\circ\text{K}$, $\bar{V} = 0.73(\text{ml/g})$, $\rho = 1.00\text{g/ml}$; $r_b = 7.2\text{cm}$, $r_m = 6.9\text{cm}$ 。

表 7-2 C_b/C_m 值和分子量与转速的关系

$M(\times 10^4)$	$C_b/C_m(\alpha)$		
	转 速 (rpm)		
	3 (0.91)	6 (0.62)	8 (0.48)
1.0	20410	24630	27690
2.0	14290	17250	19160
3.0	14272	14290	16200
4.0	10589	12590	13410
5.0	19341	11272	12590
6.0	8205	10589	11272
7.0	7447	9341	10589
8.0	6995	8766	9945
9.0	6569	8225	9341
10.0	6454	7928	8766

$r_b = 7.2\text{cm}$; $r_m = 6.9\text{cm}$; $T = 283^\circ\text{K}$; $\bar{V} = 0.73\text{ml/g}$; $\rho = 1.00\text{g/ml}$ 。

一些蛋白质实际测定时选用的转速列于表 7-3 中。

图 7-2 是 3mm 液柱时分子量、沉降系数与转速的图解。如果不知道大约的分子量则可以先进行一沉降速度实验, 大致估算一下沉降系数, 然后利用图 (7-2) 选择转速。

6. 到达平衡时间的推算 离心开始时离心池中溶液是均一的, 到达真正平衡时间误差小于 0.1% 的离心时间 $t_{0.001}$ 按下式计算:

$$t_{0.001} = 0.67(r_b - r_m)^2/D = 0.67(r_b - r_m)^2 M(1 - \bar{V}\rho)/SRT \text{ (秒)} \tag{7-4}$$

7. 缩短到达平衡的时间 从式 (7-4) 可以看出, 第一项 $(r_b - r_m)$ 越小, 到达平衡的时间越短。但是 $r_b - r_m$ 代表液柱的高, 液柱越高, 分子量越大, 测定精度越高。例如 5mg/ml 蛋白质溶液液柱 3mm 时, 分子量误差小于 1%; 而液柱 1mm 时, 到达平衡时

表 7-3 液柱 3mm, $C_b/C_m = 3$ 时合适的实验条件

溶 质	分子量	$D_{20,w} \times 10^7$	$\omega(\text{rpm})$	$t_{0.05}(\text{hr})$	$\omega'(\text{rpm})$	$t'(\text{hr})$
核糖核酸酶	12400	11.9	19000	14	27000	1.3
溶菌酶	14100	10.4	17000	16	24000	1.5
糜蛋白酶	23200	9.5	14000	16	20000	1.6
β -乳球蛋白	35000	7.82	12000	21	17000	2.0
卵白蛋白	45000	7.76	10000	22	14000	2.0
血红蛋白	60,000	6.9	9100	24	13000	2.2
血清白蛋白	66000	5.94	8300	28	12000	2.6
过氧化氢酶	250,000	4.1	4300	41	6000	3.8
纤维蛋白原	330000	2.02	3500	83	4900	7.7
脲酶	480000	3.46	3100	48	4300	4.5
肌球蛋白	570000	1.0	2800	168	3900	15.3
丛矮病毒	10,700,000	1.15	660			
烟草花叶病毒	50000000	0.3	330			

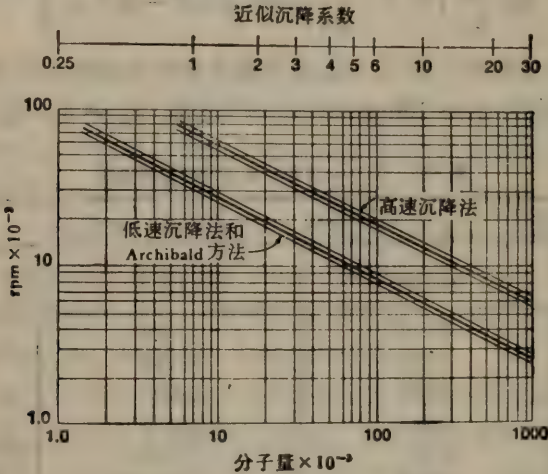


图 7-2

间缩短 9/10 (也就是说只需要原先时间的 1/10), 但分子量误差有 3%^[25]。显然必须有一定高度的液柱才能进行浓度分布分析。

缩短到达平衡时间的一个主要方法, 是离心开始时以高于平衡实验所需的转速 ω' 旋转一定时间 t' , 然后退回到选定的平衡实验转速 ω 。Herner 等^[26]实测的结果见表 7-4。

Richards 等^[25]把提高的转速 ω' 和在这个转速旋转的时间 t' 用式 (7-5) 表示:

$$2\omega'^2 t' = \frac{C_b/C_m - 1 - \ln(C_b/C_m)}{MAr_b^2 - \ln(C_b/C_m)} \quad (7-5)$$

其中 $A = \frac{(1 - \bar{V}\rho)\omega^2}{2RT}$, s 是实验条件下的沉降系数。

根据式 (7-5), 以相同的 C_b/C_m 值代入, $C_b/C_m - 1 - \ln(C_b/C_m)$ 和 $\ln(C_b/C_m)$ 的关系见图 7-3。

具体的实验步骤如下:

(1) 取 $\omega' = 1.4\omega$, 用式 (7-5) 计算 t' , 实际旋转时间再加 10%;

表 7-4 缩短到达沉降平衡的时间

溶 质	分子量	液柱 (mm)	ω (rpm)	ω' (rpm)	t' (小时)	τ (小时)	τ_0 (小时)
核糖核酸酶	13,690	3	13,000	21,000	1.1	2.2	14
胰岛素	5,800	8	14,400	19,200	15.2	16.0	76
溶菌酶	14,750	3	12,900	15,000	4.1	4.8	17

τ 采用本法达到沉降平衡的时间。

τ_0 用选定转速达到沉降平衡的时间。

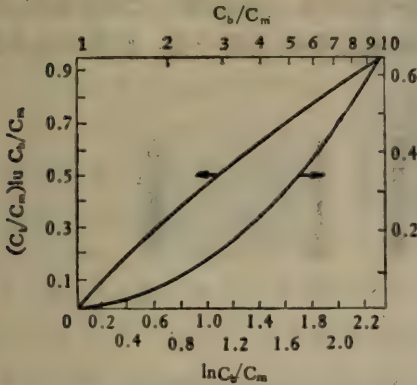


图 7-3 C_b/C_m 和 $C_b/C_m - 1 - \ln C_b/C_m$, $(C_b/C_m) \ln C_b/C_m$ 的关系

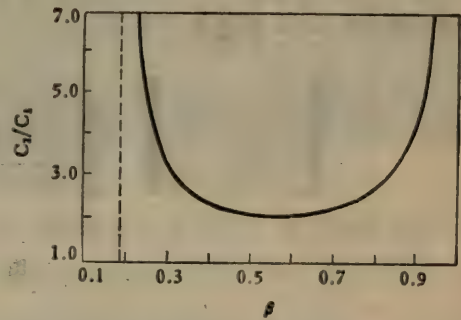


图 7-4 C_2/C_1 与 β 的关系

(2) 立即减速至 $0.7\omega'$, 旋转 $5\%t'$ 时间;

(3) 尽快加速至选定的沉降平衡转速 ω_0 。

一些蛋白质样品溶液,液柱 3mm, $C_b/C_m = 3$ 时的 ω , ω' , t' 见表 7-3。其中沉降系数、扩散系数均用该浓度测定值代替 $S_{20,w}^0$ 和 $D_{20,w}^0$, \bar{V} 设为 0.73。

另一个缩短到达平衡时间的方法,是借助于合成界面离心池,使离心开始时离心池中样品溶液不均一。Pasternak 等^[27]用合成界面离心池使样品溶液在离心开始时呈阶梯式浓度曲线,可缩短 3/4 的时间达到平衡。这种阶梯浓度曲线的选择,取决于最终希望得到的浓度分布曲线、离心池中阶梯位置的选择、 β 以及样品溶液原先的浓度比 C_2/C_1 。图 (7-4) 表示了 $C_b/C_m = 3.3$ 时, C_2/C_1 与 β 的

函数关系,可以看出曲线有一段是很平的,因此实验时加入离心池中的溶液量不那么严格。

Griffich^[28] 用了一个改进的池芯(图 7-5)。

离心开始时,浓度分布曲线有四个阶梯,在同样的液柱高度下,结合上述提高转速的方法,平衡到达时间还可缩短 2/3。Griffich 测定核糖核

酸酶的分子量为 13500 ± 150 , 与根据氨基酸组成计算的结果 13683 完全一致,只用了 48 分钟 (20410rpm)。

8. 运转 实验开始前,调节离心转头腔的温度在 $15-20^\circ\text{C}$ 之间,待转头温度接近实验温度,精确测定平衡到达时的转头温度。

为了校正离心池窗的折光,确认液面和液底的位置,在溶质分布尚未形成前,各摄一

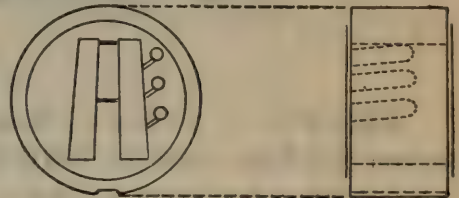


图 7-5 池芯

顿干涉光谱和 Schlieren 图谱。

加速到预定的平衡转速的 1.5 倍(缩短平衡时间),用 Schlieren 光学系统,相差片角度 60° , 不时观察图象。这时 Schlieren 图象应像图 7-6 这样变化。如果不是这样的话,可以随时更换速度。当拍下图 7-6c 这样的图象时(约为估算的平衡时间的 1/5),降速到预先选定的平衡转速,保持此转速直至计算所需的平衡时间,或者在观察屏上观察到如图 7-7 这样的图象。每隔 1—2 小时拍摄一次,将 3—5 小时内拍的图象选择一定长度(Δr)测定干涉条纹的变位。如果小于 0.03 条纹(90μ),可以认为已经平衡。如果有变化,继续旋转,直到满足下列要求:凡离心时间在 24 小时内,应在 3 小时内底片上没有变化;离心时间超过 24 小时,应在 5 小时内底片无变化。如转速选择略为高一些,液底部分条纹难以阅读,则降低 10% 转速直至平衡。

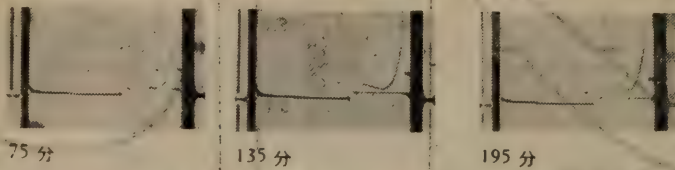


图 7-6

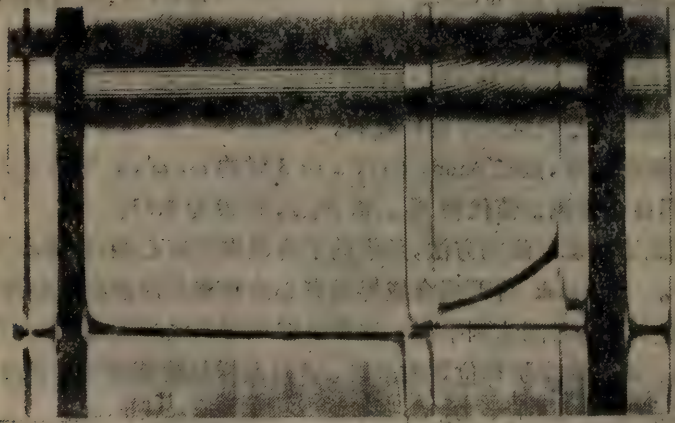


图 7-7

到达平衡后,用不同曝光时间拍摄干涉图象,以保证获得最清晰的底片。然后改用 Schlieren 光学系统,不同相差片角度拍摄。记录下转头的温度,用停表校对一下转速。待全部底片冲洗出来并得到满意的照片后,停机。

(二) 起始浓度的测定

为了计算分子量,必须知道起始浓度。并不需要知道溶质的绝对起始浓度,只要表达起始浓度的单位和平衡实验时浓度单位相一致,也就是说平衡实验如用干涉光检测,浓度以条纹数或条纹移位(μ)表示, Schlieren 光学系统以峰下面积表示(cm^2),紫外吸收光学系统是光密度。

用合成界面离心池进行起始浓度的测定，方便而且正确(图 7-8)。干涉光学系统测

定界面处条纹移位，Schlieren 光学系统测定峰下的面积代表溶质的浓度。但是用合成界面离心池测定起始浓度，有时也会在沉降平衡分子量计算中带来很大误差，其原因可能是(1)合成界面离心池中溶液和沉降平衡实验的溶液不完全相同，例如沉降平衡实验时可能样品产生不可逆解离聚合，离心池底部产生沉降以及池壁吸附等情况。或者扇形端面有些渗漏，界面过早合成，液体对流扰动梯度等。(2)透析如不充分，浓度也测不准。溶液中盐浓度高时，盐浓度会使测定产生误差。盐浓度稍高时，将会观察到峰不扩散。因此，实验过程中应很好监视界面的情况，如有反常，应重新把样品透析平衡后再做。

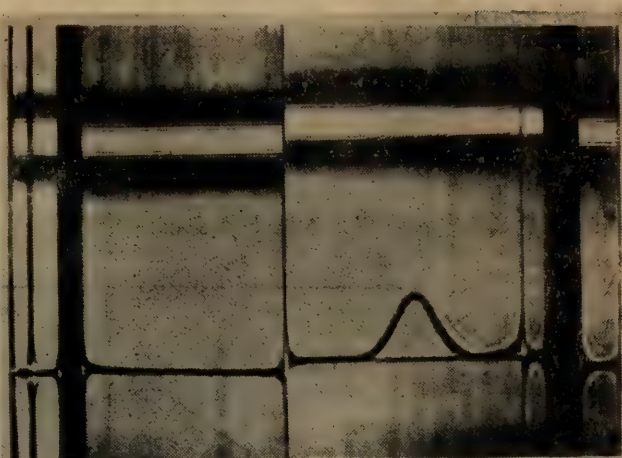


图 7-8

1. 样品溶液、溶剂 样品的溶液和溶剂应与沉降平衡实验用同一个，因此平衡实验用剩的部分样品溶液和溶剂应密闭保存，使溶质和盐浓度保持不变。

2. 离心池 用毛细管型双槽合成界面离心池(沉降平衡实验最好也用同一离心池进行)。溶液槽加溶液 0.15ml，溶剂槽加溶剂 0.35ml。加液时注意，务必在离心池直立时，毛细管内无液体。

如果沉降平衡实验用同一毛细管型双槽合成界面离心池，也可以这样操作。平衡实验结束后，取出离心池，轻轻地来回倾倒几次，使样品溶液再度均一。然后把离心池的样品注入孔朝上，注意勿使毛细管接触液体。打开溶剂槽的盖，加入同样的溶剂使满，加上盖子密闭，准备离心。

3. 运转 离心池放入转头内，待温度充分平衡后，开始离心，慢慢加速，选择和沉降平衡实验相同的温度和转速。加速至 8000rpm 时，观察溶剂流入溶剂槽后界面合成是否正常。一旦两槽液面相等，拍下第一张照片，并记下时间。以后隔一定时间摄影，记下各次摄影时间。用 Schlieren 光学系统时，相差片角度应当和平衡实验时一样。

(三) 分子量计算

[例]

1. 起始浓度计算 取几张用合成界面离心池做实验拍摄的底片，测定界面位置处的干涉条纹移位(第四章第 4 节)或 Schlieren 峰下的面积。如果界面移动，取原先界面刚合成时的位置作为 r_0 ，对每一张底片的条纹移位或峰面积乘以 $(r_t/r_0)^2$ 作校正。经过稀释校正后浓度仍随时间而减少时，则需进一步外延至 $t \rightarrow 0$ 取值。

设本例用于干涉光学系统合成界面离心池摄得底片条纹移位

$$f_0 = 28 \times 150\mu\text{m} + 32\mu\text{m} = 4232\mu\text{m} = 4.232\text{mm} = 0.4232\text{cm}。$$

2. 沉降平衡实验液面和液底位置的测定 从到达指定转速后 Schlieren 图谱测定, 如图 7-9 所示:

$$r_m = 5.62 + \frac{\Delta x_m}{F}$$

$$r_b = 5.62 + \frac{\Delta x_b}{F}$$

其中 F 是 X 轴放大倍数。本例 $F = 2.05$ 。

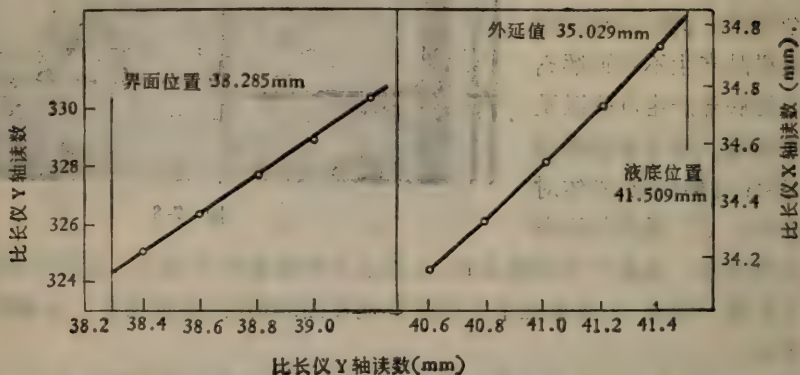


图 7-9 液面和液底 r 值的测定

3. 平衡图谱条纹移位的测定 阅读干涉条纹要很当心, 底片在比长仪下图象的 X 轴必须和比长仪的 X 轴平行。

干涉条纹移位有两种读法。一种方法是选择适当的在 Y 轴方向上某一位置, 然后沿 X 轴移动, 顺次阅读明线或暗线中心的 X 轴坐标位置。另一种方法是选定某一明线或暗线, 在 X 轴上等间隔阅读该条纹的 Y 轴值。后面这种方法在作液面浓度计算时较复杂, 不过条纹倾斜不大时(即起始浓度低, 转速小时), 不得不用这个方法。下面是这种方法的读法。

为了取读数的平均值, 至少需读 5 条条纹。从液面开始沿 X 轴作等距离移动至液底, 每隔 $0.1-0.2\text{mm}$ 读一个 Y 值。条纹移位过大, 以致于不能阅读, 可以加上下一条新条纹。以条纹半宽 ($150\mu\text{m}$) 的 5 倍, 即 $750\mu\text{m}$ 加到新读出的条纹值来表示。液面和液底的 Y 轴读数, 系以 Y 值对 X 作图, 外延至 X_m 和 X_b 来计算(见图 7-9)。

至轴心的距离 r 和 Y 轴读数的平均值 $Y_r(\text{mm})$ 列于表 7-5 中。

4. 液面浓度 C_m 的测定 式 (7-2) 可改写成:

$$\int_{r_m}^{r_b} (C - C_m) r \cdot dr = \frac{1}{2} (C_0 - C_m) (r_b^2 - r_m^2) \quad (7-6)$$

进一步按下式用条纹移位计算:

$$\int_{r_m}^{r_b} (f_r - f_m) r \cdot dr = \frac{1}{2} (f_0 - f_m) (r_b^2 - r_m^2) \quad (7-7)$$

式 (7-7) 左边从表 (7-5) 中 $(f_r - f_m) r$ 项内数值积分来求:

$$\int_{r_m}^{r_b} (f_r - f_m) r \cdot dr = (3.8400 - 3.8285)/2.05 \times 0.541/2$$

$$+ 0.02/2.05 \times \{0.541/2 + (1.534 + 2.451 + \cdots + 16.445)$$

$$+ 17.915/2\} + (4.1509 - 4.1400)/2.05 \times (17.915 + 18.723)/2$$

$$= 1.235(\text{mm} \cdot \text{cm}^2)$$

表 7-5. 低速沉降法测定 r 和 Y 轴读数的平均值

比长仪 X 轴读数 $X(\text{cm})$	距轴心距离 $r(\text{cm})$	r^2	比长仪 Y 轴读数 $y_r(\text{av.})(\text{mm})$	$(y_r - y_m)$ 即 $(f_r - f_m)(\text{mm})$	$(y_r - y_m) \cdot r$ 即 $(f_r - f_m) \cdot r$ (mm × cm)	条纹移位 $f_r(\text{mm})$	$\log f_r$
0.8981(基准)							
3.8285 (x_m)	7.050 (r_m)	49.717	32.430(外延)	0	0	3.099	0.491
3.8400	7.054	49.759	32.507	0.077	0.541	3.176	0.502
3.8600	7.064	49.900	32.644	0.214	1.534	3.313	0.520
3.8800	7.074	50.041	32.777	0.347	2.451	3.446	0.537
3.9000	7.084	50.183	32.891	0.461	3.264	3.560	0.551
3.9200	7.093	50.311	33.031	0.601	4.260	3.700	0.568
3.9400	7.103	50.453	33.172	0.742	5.273	3.841	0.584
3.9600	7.113	50.595	33.317	0.887	6.305	3.986	0.601
3.9800	7.123	50.737	33.469	1.039	7.397	4.138	0.617
4.0000	7.132	50.865	33.635	1.205	8.596	4.304	0.634
4.0200	7.142	51.008	33.798	1.368	9.767	4.467	0.650
4.0400	7.152	51.151	33.963	1.533	10.964	4.632	0.666
4.0600	7.162	51.294	34.135	1.705	12.209	4.804	0.682
4.0800	7.171	51.423	34.318	1.887	13.534	4.986	0.698
4.1000	7.181	51.567	34.513	2.083	14.954	5.182	0.714
4.0200	7.191	51.710	34.717	2.287	16.445	5.386	0.731
4.0400	7.201	51.854	34.918	2.488	17.915	5.587	0.747
4.1509(x_b)	7.205 (r_b)	51.898	35.029(外延)	2.599	18.723	5.698	0.756

其中 2.05 是放大倍数。

式 (7-7) 右边的 f_0 是用合成界面法求得的起始浓度, 在这里

$$f_0 = 4.232\text{mm}, (r_b^2 - r_m^2) = 51.898 - 49.717 = 2.181(\text{cm}^2),$$

代入式 (7-7)

$$1.235 = \frac{1}{2} (4.232 - f_m) \times 2.181$$

$$f_m = 3.099\text{mm}$$

5. $\log f_r$ 对 r^2 作图 以求得的 f_m 代入表 (7-5) 中 $(f_r - f_m)$ 项计算 f_{r0} 以 $\log f_r$ 对 r^2 作图(图 7-10), 取其斜率。因为 $f_r \propto C_r$, 所以斜率 $d \log f_r / dr^2 = d \log C_r / dr^2$ 。代入式 (7-1) 计算分子量。本例 $\bar{V} = 0.744\text{ml/g}$

$$\rho = 1.003(0.1\text{MKCl})$$

$$R = 8.313 \times 10^7 \text{ 尔格/度} \cdot \text{克分子}$$

$$T = 297.0^\circ\text{K}$$

$$\omega = 6166 \times \frac{2\pi}{60} = 6.45 \times 10^2 \text{ 弧度/秒}$$

$$M_w = \frac{2RT}{(1 - \bar{V}\rho)\omega^2} \cdot \frac{d \ln C}{dr^2} = 1.25 \times 10^5$$

[例]

1. 起始浓度测定 测定每一张合成界面离心池实验的底片上界面处总的条纹移位 J , 对时间 t 作图, 外延至 $t \rightarrow 0$, 此值 J 相当于起始浓度 C_0 , 本例为 7.23 条纹。

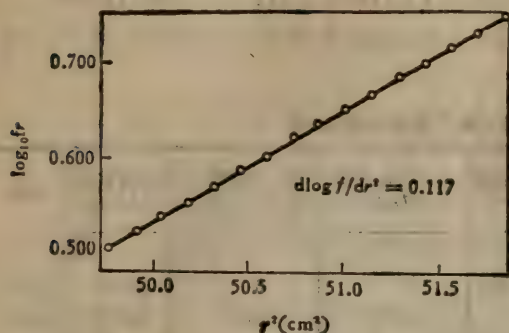


图 7-10 $\log f$ 对 r^2 作图

2. 测定每一条条纹中心至轴心的距离 选择一张最完美的底片, 放在比长仪下。比长仪的垂直刻度线位于液面, 沿 Y 轴移动使与图谱中间的一条暗条纹的中心相交, 记下 X 轴标尺读数。开始沿 X 轴移动至第一条明线的中心, 记下 X 轴标尺读数(第 0.5 条纹)。继续沿 X 轴移动直至下一条(第二条明线)的

中心, 同样记下 X 轴的标尺读数(第 1.5 条纹), 如此重复, 直至读完全片。最后记下最末一条暗条纹和液底的 X 轴标尺读数, 测定最末暗条纹和液底间的条纹分数。所得数据列表 (7-6) 中。

3. 液面浓度 C_m 的测定 液面浓度 C_m 由下式计算

$$C_m = C_0 - \frac{r_b^2(C_b - C_m) - \int_{r_m}^{r_b} r^2 dC}{r_b^2 - r_m^2} = C_0 - \frac{r_b^2(C_b - C_m) + \Delta j \Sigma_{r_m}^{r_b} r^2}{r_b^2 - r_m^2} \quad (7-8)$$

从表 7-6 的数据

$$\Delta j \Sigma_{r_m}^{r_b} r^2 = \{46.408 + 47.321 + \dots + 50.311\} \times 1 + \frac{50.311 + 50.481}{2} \times 0.15 = 544.545$$

表 7-6 低速沉降法测定分子量的数据

条纹编号	X 轴标尺读数 (cm)	r (cm)	r^2 (cm ²)	C (条纹数)	$\log_{10} C$
0 (液面)	14.196	6.792	46.131	3.02	0.480
0.5	14.268	6.827	46.408	3.52	0.547
1.5	14.377	6.879	47.321	4.52	0.655
2.5	14.457	6.917	47.845	5.52	0.742
3.5	14.531	6.953	48.344	6.52	0.814
4.5	14.581	6.979	48.706	7.52	0.876
5.5	14.639	7.004	49.056	8.52	0.930
6.5	14.684	7.026	49.365	9.52	0.979
7.5	14.726	7.046	49.646	10.51	1.001
8.5	14.759	7.062	49.872	11.52	1.061
9.5	14.796	7.079	50.112	12.52	1.098
10.5	14.824	7.093	50.311	13.52	1.131
11.15 (液底)	14.850	7.105	50.481	14.17	1.151

最后暗条纹是第 11 条纹, 条纹分数 = 0.15。

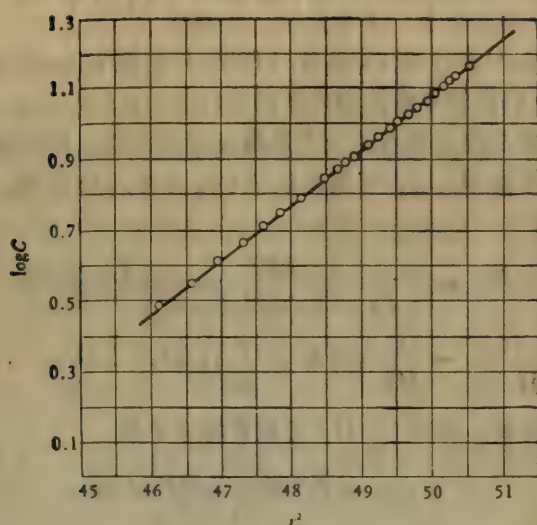


图 7-11 $\log C$ 对 r^2 作图

$\Delta j \Sigma_{r_m}^b r^2$ 也可以用图解法计算。取 r^2 的数值为 Y 轴, 条纹移位数为 X 轴, 则曲线在 $r = r_m$ 和 $r = r_b$ 之间的面积就是 $\Delta j \Sigma_{r_m}^b r^2$ 。代入式 (7-8)

$$C_m = 7.23 - \frac{50.481(11.15-0)-544.545}{50.481-46.131} = 3.02$$

4. $\log C$ 对 r^2 作图 离轴心不同距离的条纹数是把该位置的条纹移位加上液面浓度的条纹数(表 7-6)。以 $\log C$ 对 r^2 作图(图 7-11), 斜率 $d \log C / dr^2 = 0.1565$ 。已知

$$(1 - \bar{V}\rho) = 0.277$$

$$\text{转速} = 15.000 \text{ rpm}$$

$$\text{温度} = 12.4^\circ\text{C}$$

因此

$$M_w = \frac{2RT}{(1 - \bar{V}\rho)\omega^2} \cdot \frac{d \ln C}{dr^2} = \frac{2 \times 8.313 \times 10^7 \times 285.6}{0.277 \times 2.467 \times 10^6} \times 2.303 \times 0.1565$$

$$= 2.504 \times 10^4$$

(四) 样品溶液的不均一性和非理想性

(1) $\log C$ 对 r^2 作图, 其斜率与分子量成正比。均一的理想溶液下此线是一直线, 从斜率可计算分子量。如果是曲线, 则曲线上每一点的切线和该点的显示分子量成正比。曲线向下弯(即浓度增加斜率变小), 一般说来样品是非理想溶液; 相反, 曲线向上凸起, 表示溶质不均一。曲线上各点切线的斜率与混合物的重均分子量成正比。要指出的是, 有时不均一的非理想溶液, 由于曲率相互抵销, $\log C$ 对 r^2 作图仍然得到一条直线。因此从一个浓度测定的结果来对该溶液的理想性和均一性下结论是不够的, 必须变换起始浓度和转速进行实验。浓度高对非理想性影响大, 高转速对不均一性影响大, 这是很清楚的。

(2) 如果经其他方法确证样品是均一的, 而样品的 $\log C$ 对 r^2 作图得到向下弯的曲线, 那末各点切线的斜率用最小二乘法求出, 可计算显示分子量 $[M_{app}(r)]$, 而

$$\frac{1}{M_{app}(r)} = \frac{1}{M^0} + \left(B + \frac{\bar{V}}{M^0} \right) C(r) + \dots \quad (7-9)$$

其中 B 是常数。以 $M_{app}(r)$ 对 $C(r)$ 或 $f(r)$ 作图, 外延至 $C \rightarrow 0$, 可求出 M^0 变更起始浓度, 在较广的浓度范围内作图更好。

(3) 不均一体系求曲线上各点的分子量是没有意义的。不同的起始浓度求出离心池中样品的显示重均分子量 $\bar{M}_{W,app}$, 将其倒数对 $(C_b + C_m)/2$ 作图, 外延至 $(C_b + C_m)/2 \rightarrow 0$, 可求得 M_w^0 。

$$\bar{M}_{W,app} = \frac{2RT}{(1 - \bar{V}\rho)\omega^2(r_b^2 - r_m^2)} \frac{C_b - C_m}{C_0} \quad (7-10)^{[29]}$$

$$\frac{1}{\bar{M}_{W,app}} = \frac{1}{M_w^0} + \left(B + \frac{\bar{V}}{M} \right) \left(\frac{C_b + C_m}{2} \right) + \dots \quad (7-11)$$

这里得到的是重均分子量。由式 (7-12) 可求 Z 均分子量:

$$M_{Z,app} = \frac{M_{W,b}C_b - M_{W,m}C_m}{C_b - C_m} \quad (7-12)$$

其中 $M_{W,b}$ 和 $M_{W,m}$ 分别是液底和液面的重均分子量。

(五) 光电扫描装置的应用

应用光电扫描装置的优点是沉降平衡测定时溶质浓度非常低, 因此可以更准确地外延至无限稀释。从记录纸上直接得到浓度, 不需要再用合成界面离心池做一次实验。

实验的准备和离心池的安装, 充填如上所述。样品起始浓度的光吸收选在 0.5 光密度或更低一些。选择一个光吸收和浓度成比例的波长, 通常样品的最大吸收波长可满足这个条件。离心时同样采用提高转速的方法以缩短到达平衡的时间。不时扫描图象, 当记录纸上代表靠近离心池顶那一半部分液体的浓度分布呈直线时, 降速至平衡实验速度。到达平衡前后, 隔一定时间扫描, 要求凡离心时间在 24 小时, 应在 3 小时内扫描图谱无变化, 离心时间超过 24 小时, 应在 5 小时内扫描图谱不变。确证已达到平衡, 用最慢的扫描速度、最低噪音扫描几张图谱。

在记录纸上读出离轴心距离 r 与相应的光密度值。一般 r 取 15—20 点。光密度 (O. D) 如果和浓度成正比, 则不需再换算成浓度, 直接以 $\log_{10}(\text{O. D})$ 对 r^2 作图, 取直线斜率代入式 (7-1) 计算分子量。

本法计算分子量的准确度, 在很大程度上取决于记录纸上基线取得是否正确。用下列方法操作可以减少可能产生的误差。当平衡实验已经做完, 浓度分布曲线已经记录下来, 这时不停机, 相反把转速提高到转头允许的最高转速, 连续转几小时, 此时离心池的上半部分将为纯溶剂区, 因为大分子溶质已沉降。然后迅速降至原先平衡实验时的转速, 立即扫描几张图谱。以离心池内溶剂区曲线的平均位置作为基线, 从这个位置来计算平衡曲线上浓度的分布。

(六) 不需要知道起始浓度的算法

上述应用光电扫描装置当然不需要知道起始浓度就可以计算分子量, 不过这里主要是指用其他光学方法得到的数据, 不用起始浓度计算分子量的方法。

1. Schlieren 沉降平衡图谱计算 Lamm^[30] 最早提出这个方法,但是没有被广泛应用。本法的缺点是应用 Schlieren 光学系统灵敏度较低,并且对是否真正平衡的反应敏感。不过可应用相差片提高灵敏度,借助于干涉光学系统来检测是否达到平衡。除了上述这二点外,本法计算的结果是准确的。它的优点是不需要再用合成界面离心池做一次实验,不要测量液柱的两端,不要换算溶质量,计算也非常简单。对多分散体系计算结果是 Z 均分子量。

实验完全和上述一样,在 Schlieren 沉降平衡图谱上测量一系列 r 处的 dc/dr 值,以 $\log \left[\frac{1}{r} \cdot \frac{dc}{dr} \right]$ 对 r^2 作图,取其斜率 $d \log \left[\frac{1}{r} \frac{dc}{dr} \right] / dr^2$ 代入下式计算分子量

$$M = \frac{2RT}{(1 - \bar{V}\rho)\omega^2} \frac{2.303d \log \left[\frac{1}{r} \frac{dc}{dr} \right]}{dr^2} \tag{7-13}$$

2. 干涉光图谱计算 Nazarian^[31] 提出只需要测定干涉光图谱的条纹移位,用相对浓度计算分子量的方法。对均一的溶质来讲,离心池中 r_n 和 r'_n 处 ($r_n'^2 - r_n^2 = \text{常数 } Q$) 之间的干涉条纹移位 $\Delta_0 J$ 相当于它们之间的浓度差。代入下式计算分子量

$$M = \frac{2RT}{(1 - \bar{V}\rho)\omega^2} \frac{d \ln \Delta_0 J}{dq} \tag{7-14}$$

其中 $q = r^2$, $\Delta_0 J = J(q + Q) - J(q)$ 。

每一对测量位置 ($q_n, q'_n = q_n + Q$) 要换算成离心池中的真实位置 ($r_n = q_n^{1/2}$, $r'_n = q_n'^{1/2}$)。表 (7-6) 列举了液柱高 3mm 左右的每一对测量条纹移位离轴心距离。这些距离可以通过放大倍数 F 计算相应的图片上的位置 ($R = (r - r_0)F$), 以这些对位置的条纹移位的对数对 r^2 作图,从斜率求分子量。

表 7-6 3mm 液柱适宜测量条纹移位的每一对距轴心的距离

n	$q_n \text{ (cm}^2\text{)}$	$q'_n \text{ (cm}^2\text{)}$	$r_n \text{ (cm)}$	$r'_n \text{ (cm)}$
a	47.47	(-)	6.890	(-)
1	47.60	49.60	6.8993	7.0569
2	47.80	49.80	6.9138	7.0711
3	48.00	50.00	6.9282	7.0852
4	48.20	50.20	6.9426	7.0993
5	48.40	50.40	6.9570	7.1134
6	48.60	50.60	6.9714	7.1274
7	48.80	50.80	6.9857	7.1414
8	49.00	51.00	7.0000	7.1454
9	49.20	51.20	7.0143	7.1554
10	49.40	51.40	7.0285	7.1694
b	(-)	51.78	(-)	7.196

二、高速沉降平衡法测定分子量

高速沉降平衡法又称 Yphantis 法,因为 1964 年 Yphantis 首先应用本法测定分子量^[32]。高速沉降平衡法测定分子量的原理和低速沉降平衡法测定分子量的原理相同,它

们之间的区别在于前者转速高,约2—3倍于低速沉降平衡,液面附近的溶质浓度事实上等于零,所以称之为高速沉降平衡法。和低速沉降平衡法相比较,高速沉降平衡法的优点是:(1)离心结束时,知道离心池中溶液的绝对浓度,不需要再用合成界面离心池做实验测定起始浓度;(2)可以在更低的浓度测定,因此一些难溶样品也有可能测定;(3)计算简单,除非是特殊情况。不需要测定液底,做一次实验就可以得到无限稀释时的分子量;(4)平衡到达时间较短(不超过24小时);(5)低速沉降平衡法不能测定的大分子量(10^6 数量级)溶质也可能测定。它的缺点是:(1)因为液面附近溶质浓度实际上为零,所以不能测定分子量低于 10^4 的物质,样品中如混有较低分子量的物质,则不可能测定分子量;(2)溶质在离心池底部沉积,不可能分析溶质总的分子量分布;(3)转速较高,离心池窗光偏析大;(4)精度较低。

(一) 实验方法

1. 样品配制、光学系统、离心池 样品溶液的配制同低速平衡实验(第48页),对溶剂宜作长时间透析,务必使透析平衡。高速沉降实验不用 Schlieren 光学系统,大多采用干涉光学系统,也可用紫外扫描光学系统。蛋白质样品溶液浓度范围为0.1—2.0mg/ml,一般做法是在此浓度范围内取三个值进行测定。离心池窗宜用宝石窗。离心池除用常规的双槽离心池外,也可采用有六个槽的池芯(图3-4,第10页),同时进行三个样品分析。和低速沉降平衡实验一样,样品溶液和溶剂分别放入指定的离心池槽内。

溶液槽: 溶液 0.11ml

底液 0.01—0.02ml

溶剂槽: 外透液 0.12—0.13ml (不必过量)

2. 转速 和低速沉降平衡一样,从大致已知分子量的情况下按下式估算:

$$\sigma^2 = \frac{\omega^2 M (1 - \bar{V} \rho)}{RT} = \frac{\omega^2 S}{D} \quad (7-15)$$

其中 σ 是有效还原分子量, M 是分子量, \bar{V} 是偏微比容, ρ 是溶液密度(可用溶剂密度代), R 是气体常数, 8.31×10^7 尔格/度·克分子; T 是温度(K); S 、 D 分别是测定浓度的沉降系数和扩散系数; ω 是转速(弧度/秒; $\text{rpm} \times \frac{2\pi}{60}$)。Teller^[23]和Yphantis^[32]分别计算的分子量和转速的关系列表7-7中,实际实验时可把表中数值作为选择转速的上、下限。

更方便的方法是用图7-2(第50页)来估算高速沉降平衡应选的转速。如果不知道分子量近似值(或范围),则可先做一沉降速率实验,粗略计算一下沉降系数,然后用图7-2计算。

实际操作时转速也可在离心过程中确定,因为改变转速后平衡很快又会建立。可选择液柱中间部位浓度为零作为最适转速。

3. 平衡到达需要的时间 液柱为3mm时,液底浓度 C_b 和液面浓度 C_m 之差, $C_b - C_m$,和真正达到平衡时的 $C_b - C_m$ 之值误差小于0.1%所需的时间,约为溶质自液面 r_m 沉降到底 r_b 所需时间 t_s 的二倍^[32]。设溶质的沉降系数为 s ,则 t_s 以下式表示:

$$t_s = 2(r_b - r_m) / \omega^2 \cdot s (r_b + r_m) \quad (7-16)$$

4. 运转 高速沉降法到达平衡的时间较低速沉降平衡法短得多,虽然也可以用提

表 7-7 高速沉降平衡法分子量和转速的关系*1

分子量×10 ⁴	转 速 (rpm)	
	Teller 法*2	Yphantis 法*3
2.0	35,600	44,770
3.0	29,500	37,020
4.0	25,980	31,410
5.0	23,150	27,690
6.0	20,410	25,980
7.0	19,160	24,630
8.0	17,980	21,740
9.0	17,250	20,410
10.0	16,200	16,200
15.0	13,410	14,290
20.0	11,272	12,590
25.0	10,589	11,270
30.0	9,341	10,589
35.0	8,766	9,945
40.0	8,225	9,341
45.0	7,928	8,766
50.0	7,447	—

*1 $T = 283^{\circ}\text{K}$, $\bar{V} = 0.73\text{ml/g}$, $\rho = 1.00\text{g/ml}$, $\sigma = M(1 - \bar{V}\rho)\omega^2/RT$ 转速取最接近的 Beckman Spinco E 型分析离心机机械控速值。

*2 液柱 2mm, 六槽池蕊的中央计算, $\sigma^2 = 3.3(\text{cm}^{-2})$

*3 $\sigma^2 = 5.0\text{cm}^{-2}$

高转速来缩短到达平衡的时间,但并不常用。离心开始后,当速度达到预选的平衡速度时摄影一幅。接近平衡时,图像必须象图 7-12 一样。以后每隔一小时拍摄一次,直至不能测出连续拍的两张底片上的差异(小于 0.03 条纹移位)。平衡时条纹必须在离心池的上半部分呈直线状态,以保证液面浓度为零。如果条纹直线部分大于或小于液柱半高,则改变速度再度平衡。最后摄影几幅,以保证得到一张清晰的照片。

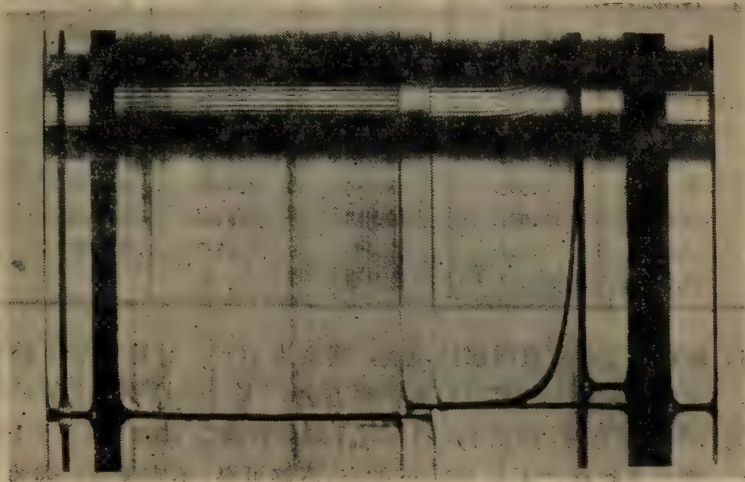


图 7-12

(二) 记算

(1) 条纹移位的读法：取一合适的底片，从液面开始选择一条清晰的条纹，在比长仪上按一定间隔读出条纹的 $y(r)$ 值。在条纹平坦部分每隔 0.05cm 读一次，条纹开始上挠后，隔 0.01—0.02cm 读一次，直至底片上离心池的底部，或者条纹过于密集以至无法阅读为止。如果所选条纹出格，则向底线下移四条条纹再继续读数，所得读数加上 4 乘条纹间垂直距离 $y(r)$ 。共读 5 条条纹，在每一 r 处取其平均值计算。表 7-8 是读数记录的一例。

表 7-8 高速沉降平衡法计算分子量的数据

编 号	X 轴读数 (cm)	r (cm)	r^2 (cm ²)	y 轴读数 $y(r)$, (cm)	$y(r) - y_0$ (cm)	$\log[y(r) - y_0] + 3$
1(液面)	13.792			3.4192	平均 $(y_0) = 3.4192$	
2	13.842			3.4188		
3	13.892			3.4193		
4	13.942			3.4193		
5	13.992			3.4193		
6	14.042			3.4197		
7	14.092			3.4197		
8	14.142			3.4203		
9	14.192			3.4207		
10	14.242			3.4217		
11	14.292			3.4244		
12	14.312	6.848	46.892	3.4050	0.0058	0.763
13	14.332	6.857	47.014	3.4261	0.0069	0.839
14	14.352	6.867	47.156	3.4280	0.0088	0.944
15	14.372	6.877	47.286	3.4310	0.0188	1.072
16	14.392	6.886	47.148	3.4351	0.0159	1.201
17	14.412	6.896	47.551	3.4376	0.0184	1.265
18	14.432	6.905	47.683	3.4439	0.0247	1.393
19	14.452	6.915	47.815	3.4499	0.0307	1.487
20	14.472	6.924	47.947	3.4556	0.0364	1.561
21	14.492	6.934	48.080	3.4656	0.0464	1.667
22	14.512	6.944	48.212	3.4754	0.0562	1.750
23	14.532	6.953	48.346	3.4881	0.0689	1.838
24	14.552	6.963	48.479	3.5042	0.0850	1.929
25	14.572	6.972	48.612	3.5216	0.1024	2.010
26	14.592	6.982	48.746	3.5466	0.1274	2.105
27	14.612	6.991	48.880	3.5740	0.1548	2.190
28	14.632	7.001	49.013	3.6100	0.1908	2.281
29	14.653	7.011	49.147	3.6543	0.2351	2.371
30(液底)	14.697	7.032	49.443			

从表 7-8，取底片上条纹直线部分为 y_0 ，其余为 $y(r)$ ，计算每一 r 处的条纹移位 $[y(r) - y_0]$ 。求出 r 距轴心的实际距离，平方之。以 $[y(r) - y_0]$ 对 r^2 作图。如用 $\log[y(r) - y_0]$ ，作图更方便，所以 $[y(r) - y_0]$ 项最好乘以 1000（相当于 \log 数字加 3），如表 7-8 所示。那些条纹移位不足 0.01cm 的点，不够可靠，不宜采用。因为 $[y(r) - y_0]$ 与溶质浓度成正比， $\log[y(r) - y_0]$ 对 r^2 作图所得曲线的斜率和低速沉降平衡法一样，

代入式 (7-1), 测定偏微比容和溶液的密度后, 计算分子量。

$$(1 - \bar{V}\rho) = 0.262$$

$$\text{转速} = 30,000\text{rpm}$$

$$T = 16.8^\circ\text{C}$$

从图 7-13

$$\frac{d \log [y(r) - y_0]}{dr^2} = 0.659 \quad \left(\text{相当于} \frac{d \log C}{dr^2} \right)$$

代入式 7-1

$$M = \frac{2RT}{(1 - \bar{V}\rho)\omega^2} \cdot \frac{2.303(d \log C)}{dr^2} = \frac{2 \times 8.313 \times 10^7 \times 290.0}{0.262 \times 9.870 \times 10^6} \times 2.303 \times 0.659$$

$$= 2.83 \times 10^4$$

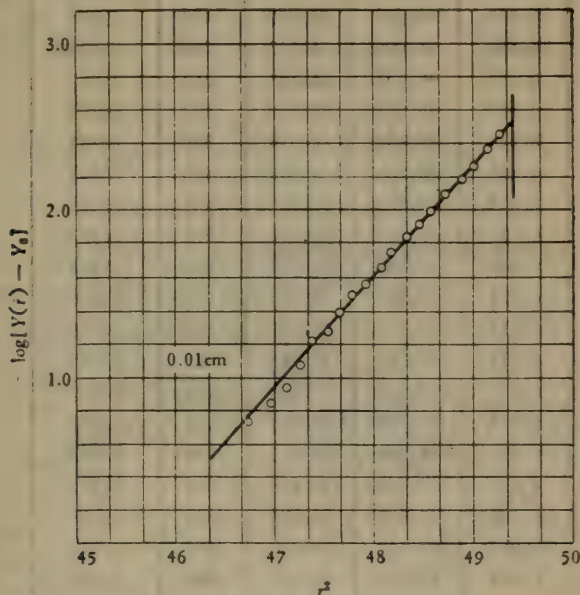


图 7-13 $\log [Y(r) - Y_0]$ 对 r^2 作图。斜率 $= 0.659$

以前曾提及, 在一个浓度、离心一次只能得到显示分子量。不过在高速沉降平衡实验上述计算中, 接近液面部分的离心池上半部浓度趋向无限稀释, 因此在这低浓度一侧的 $\log [y(r) - y_0]$ 对 r^2 作图, 如果得到一条直线的话, 可以认为计算值与浓度无关, 即可以认为是无限稀释时的分子量。当然这可以通过不同的浓度, 不同的速度所做的实验来验证。

(2) 和低速沉降平衡实验结果不同, 所得图象与离心池上半部相应的干涉条纹必须平直。如果仅仅是看起来似乎很平而实际并不和 X 轴平行, 那末计算结果就不准确。之所以产生这种现象有三种可能: ①溶液起始浓度太大; ②转速过低; ③有低分子化合物混入(包括溶质的解聚)。对于前两种情况, 实验最好重做。把溶液稀释, 用较高转速。第三种情况应将样品再次透析, 去除小分子。如果无效, 则不能用本法测定分子量。

(3) $\log [y(r) - y_0]$ 对 r^2 作图, 得到的不是直线, 那末和低速沉降平衡法一样, 反映了溶质的不均一性或溶液是非理想溶液。如果已确证样品溶液是均一的非理想溶液, 可用最小二乘法求出各 r 点的 $[d \ln [y(r) - y_0]/dr^2]$, 计算显示分子量。

表 7-9 高速沉降法测定非理想溶液的例子
(胶原, 0.3mg/ml, 0.1M 柠檬酸缓冲液, pH3.7)

编 号	X 轴比长仪 读数 (mm)	离轴心距离 (cm)	$r^2(\text{cm}^2)$	Y 轴比长仪 读数 $y(r)_{\text{av.}}$ (mm)	$y(r) - y_0$ (μm)	$\log_{10}(y(r) - y_0)$	$\frac{d \ln(y(r) - y_0)}{dr}$	M_{app}
1(基准线)	18.147							
2(液面)	40.840							
3	41.000			36.638	} 平均 $y_0 = 36.639 \text{ mm}$			
4	41.250			36.640				
5	41.500			36.640				
6	41.750			36.639				
7	42.000			36.639				
8	43.000			36.646				
9	43.300	6.824	46.567	36.707	140	2.146		
10	43.400	6.828	46.622	36.779	173	2.238		
11	43.500	6.833	46.690	36.812	216	2.334	3.03	2.96×10^4
12	43.600	6.838	46.758	36.853	261	2.417	2.74	2.68
13	43.700	6.843	46.827	36.900	312	2.494	2.47	2.42
14	43.800	6.848	46.895	36.943	359	2.555	2.34	2.29
15	43.900	6.853	46.964	36.998	420	2.623	2.28	2.23
16	44.000	6.858	47.032	37.059	491	2.691	2.24	2.19
17	44.100	6.863	47.101	37.130	571	2.757	2.16	2.11
18	44.200	6.868	47.169	37.210	650	2.813	2.05	2.00
19	44.300	6.872	47.224	37.289	752	2.876	1.83	1.79
20	44.400	6.877	47.293	37.391	849	2.929	1.64	1.60
21	44.500	6.882	47.362	37.488	922	2.965	1.50	1.47
22	44.600	6.887	47.431	37.561	1026	3.011	1.46	1.43
23	44.700	6.892	47.500	37.665	1132	3.054	1.44	1.41
24	44.800	6.897	47.569	37.771	1249	3.097	1.34	1.31
25	44.900	6.902	47.638	37.888	1355	3.132	1.23	1.20
26	45.000	6.906	47.693	38.094	1468	3.167	1.15	1.12
27	45.100	6.911	47.762	38.107	1582	3.199	1.11	1.09
28	45.200	6.916	47.831	38.221	1705	3.232	1.07	1.05
29	45.300			38.244	1825	3.261		
30	45.400			38.464	1963	3.293		
31	45.528			38.602				
32(液底)								

表 7-9 是用高速沉降平衡法测定胶原的例子。 $\log [y(r) - y_0]$ 对 r^2 作图是一条向下弯的曲线(图 7-14), 表示是非理想溶液。各点显示分子量的计算如下:

取任一点作为中心点, 在其前后各取两点, 分别以脚注 +2, +1, 0, -1, -2 表之。点与点的间隔为 Δx_0 。每点的 $\log [y(r) - y_0]$ 值记为 $U_{+2}, U_{+1}, U_0, U_{-1}, U_{-2}$ 。从这 5 个值计算 0 点的 dU/dx_0 。

$$\left(\frac{dU}{dx}\right)_0 = \frac{0.1}{\Delta x} (2U_{+2} + U_{+1} - U_{-1} - 2U_{-2}) \tag{7-17}$$

这里 Δx 是比长仪上 X 轴读数间隔。而

$$\left\{ \frac{d \log [y(r) - y_0]}{dr^2} \right\} \simeq \frac{1}{2} \left(\frac{dU}{dx} \right)_0 \frac{F}{r} \tag{7-18}$$

其中 F 是 X 轴的放大倍数。计算举例如下(数据见表 7-9)。

[例] $r^2 = 47.500\text{cm}^2 (r = 6.892\text{cm})$

$$\left(\frac{dU}{dx}\right)_{r=6.892} = \frac{0.1}{0.01} \times (2 \times 3.132 + 3.097 - 3.011 - 2 \times 2.695) = 4.20$$

从式 (7-18)

$$\frac{d \ln [y(r) - y_0]}{dr^2} = \frac{2.303}{2} \times 4.20 \times \frac{2.05}{6.892} = 1.44 (F = 2.05)$$

以 $\bar{R} = 8.31 \times 10^7$ 尔格/度·克分子, $T = 296^\circ\text{K}$,

$\omega = 12590\text{rpm} \times \frac{2\pi}{60}$ 弧度/秒, $\bar{V} = 0.695$, $\rho =$

1.017 代入式 (7-1)

$$M_{app, r=6.892} = \frac{2RT}{(1 - \bar{V}\rho)\omega^2} \frac{d \ln [y(r) - y_0]}{dr^2} = 0.978 \times 10^5 \times 1.44 = 1.41 \times 10^5$$

在一系列的点上计算 M_{app} (表 7-9), 将这些数值的倒数对浓度 $[y(r) - y_0]$ 作图, 外延至 $[y(r) - y_0] \rightarrow 0$ 得无限稀释时分子量 M^0 (图 7-15)。

(4) 多分散体系也可用上述最小二乘法计算 $\log [y(r) - y_0]$ 对 r^2 曲线上各 r 点的平均分子量。

各点的数均分子量 $M_n(r)$ 、重均分子量 $M_w(r)$ 、Z 均分子量 $M_z(r)$ 按下式计算:

$$M_n(r) = \frac{2RT}{(1 - \bar{V}\rho)\omega^2} \cdot \frac{C(r)}{\int_{r_m}^r C(r) dr} \quad (7-19)$$

$$M_w(r) = \frac{2RT}{(1 - \bar{V}\rho)\omega^2} \cdot \frac{d \ln C}{dr^2} \quad (7-10)$$

$$M_z(r) = \frac{RT}{(1 - \bar{V}\rho)\omega^2} \cdot \frac{d \left(\frac{1}{r} \cdot \frac{dC(r)}{dr} \right)}{dC(r)} \quad (7-20)$$

高速沉降平衡法测定分子量的一个条件是液面浓度实际为零, 因此式 (7-19) 的分母积分就可计算数均分子量 M_n 。

至于 Z 均分子量的计算, 因 $\frac{1}{r} \frac{dC_r}{dr} = 2 \left(\frac{dC_r}{dr^2} \right)$, 先按式 (7-17) 以一定间隔用最小二乘法计算之, 所得之值对 C 作图, 再一次用最小二乘法求出斜率, 计算分子量。

在液面浓度等于零的条件下, 全部溶质的重均分子量 \bar{M}_w 、Z 均分子量 \bar{M}_z 可用式 (7-21)、(7-22) 计算

$$\bar{M}_w = M_r(r_b) \quad (7-21)$$

$$\bar{M}_z = M_w(r_b) \quad (7-22)$$

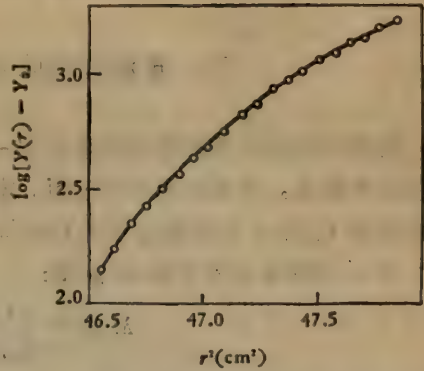


图 7-14 高速沉降平衡法。 $\log [Y(r) - Y_0]$ 对 r^2 作图

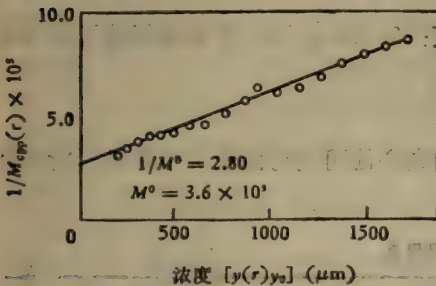


图 7-15 分子量的浓度依存性

不过必须在离心池底部没有溶质沉积。另外液底干涉条纹移位的测量困难,虽可用外延法来求,但容易带来很大误差,所以几乎不用这个方法计算。

三、短液柱沉降平衡法(中点法)测定分子量

沉降平衡到达的时间可以用式(7-4)计算,和离心池中液柱高度的平方成正比,因此液柱高度降低,平衡时间大为缩短。本法就是利用短液柱和达到沉降平衡后浓度相当于起始浓度 C_0 的 r' 处的浓度梯度 $(dC/dr)_{r'}$ 来计算分子量的^[37]。

在 r' 处的显示分子量 M_{app} 是:

$$M_{app} = \frac{1}{C_{0,r'}} \left(\frac{dC}{dr} \right)_{r'} \frac{RT}{(1 - \bar{V}\rho)\omega^2} \quad (7-23)$$

分子量的浓度依存性用下式表示:

$$\frac{1}{M_{app}} = \frac{1}{M^0} + \left(B + \frac{\bar{V}}{M^0} \right) C_0 + \dots \quad (7-24)$$

本法的优点是测定分子量所需时间非常短,不过需要另外测定起始浓度。本法只能测定离心池中一点的分子量,因此,对样品是否均一、是理想溶液还是非理想溶液不能进行分析。不过比较不同溶剂对样品的影响,或者同时做许多样品的比较,应用本法是很方便的。

(一) 实验方法

1. 样品配制, 光学系统和离心池 样品浓度: 3—10mg/ml, 溶剂同低速沉降平衡法(第48页)。

光学系统: 只用 Schlieren 光学系统。

离心池: 用双槽或多槽离心池。用特别的多槽离心池可同时测定7个样品, 所需样品量极微(表7-10), 用微量注射器注入。

表 7-10 短液柱法样品用量

	双槽池	多槽池
溶液槽 底液	0.04ml	0.005ml
溶液槽 溶液	0.03ml	0.017ml
溶剂槽	0.08ml	0.023ml
液柱高	1mm	0.7mm

2. 转速 van Holde 等指出^[33], 沉降平衡到达后, 如果液柱短, 则在

$$r' = \sqrt{\frac{r_b^2 + r_m^2}{2}}$$

(其中 r_b 、 r_m 分别为液底和液面)处的溶质浓度 $C(r')$ 以下式表示:

$$C(r') = C_0 H / \sinh H = C_0 / (1 + H^2/6 + \dots) \quad (7-25)$$

其中 C_0 是起始浓度, $H = \omega^2 M (1 - \bar{V}\rho) (r_b^2 - r_m^2) / 4RT$ 。液柱短时, r' 可看作液柱的 \bar{r} , 即 $r \doteq \bar{r} = \frac{r_m + r_b}{2}$ (实际情况是 1mm 液柱, $\bar{r} - r' < 0.002\text{mm}$)。因此如果液柱短,

H 小则 $C(\bar{r}) \simeq C_0$ 。通常以 $H < 0.25$ 来选转速 ω ，其时液柱中点处的浓度 $C(\bar{r})$ 和起始浓度之差小于 1%。

3. 运转 可参照低速沉降平衡法运转一节(第 51 页)。因为液柱甚短，可以不必加速到高于平衡实验所需的转速来缩短到达沉降平衡的时间。到达预定速度后，观察液柱中点的浓度梯度， $(dC/dr)_{r=\bar{r}}$ 。每隔 30 分钟拍摄一次。直至 $(dC/dr)_{r=\bar{r}}$ 的变化在测量误差范围以内。相差片的角度应尽量用得大一些(一般用 80°)，摄影几帧，保证至少有一张清晰、满意的底片。

(二) 计算

1. 起始浓度的测定 见低速沉降平衡法起始浓度测定一节(第 52 页)。相差片的角度要和平衡实验时的角度相同，从合成界面峰的面积计算起始浓度。

2. 液柱中点距轴心的距离和该处浓度梯度的测定 在液柱中点处 $(\bar{r} = \frac{r_m + r_b}{2})$ 测定 Schlieren 曲线(图 7-16)线宽中心的高度(溶剂基线的中心至溶质梯度曲线中心的距离)，代入式(7-26)，计算显示分子量

$M_{app,\bar{r}}$

$$M_{app,\bar{r}} = \frac{1}{C_{0,\bar{r}}} \left(\frac{dC}{dr} \right)_{r=\bar{r}} \frac{RT}{\omega^2(1 - \bar{V}\rho)}$$

(7-26)

其中 C_0 是起始浓度，相当于合成界面峰下的面积[底片上峰的面积 \div X 轴的放大倍数 ($F = 2.05$)]； Y 轴的放大倍数和 (dC/dr) 项中 Y 轴的放大倍数正好抵消，不必考虑]； \bar{r} 是至轴心的距离(cm)；

$\left(\frac{dC}{dr} \right)_{r=\bar{r}}$ 是 \bar{r} 处底片上 Schlieren 曲线的高度(cm)； R 是气体常数 (8.313×10^7 尔格/度·克分子)； T 是温度(K)； ω 是角速度 (弧度/秒， $\text{rpm} \times \frac{2\pi}{60}$)； \bar{V} 是偏微比容， ρ 是溶液密度(实际上由于样品浓度很稀，以溶剂密度代之)。计算结果列于表 7-11 中。

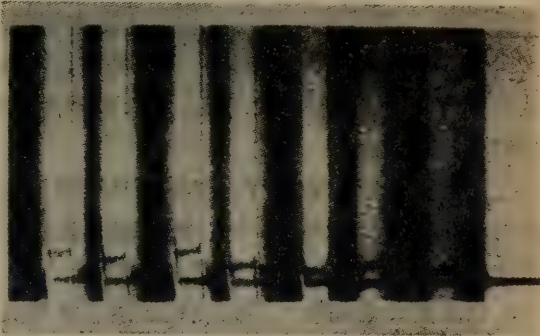


图 7-16 中点超离心法

表 7-11 中点法测定分子量的例子(图 7-16)

槽 号	1	2	3	4	5	6	7
起始浓度 (mg/ml)	10	8	10	6	4	6	4
$C_0 \times 10^2 (\text{cm}^3)$	5.94	4.75	5.94	3.56	2.38	3.56	2.38
$\bar{r} (\text{cm})$	6.19	6.33	6.53	6.67	6.86	7.00	7.19
$(dC/dr)_{r=\bar{r}} \times 10 (\text{cm})$	1.37	1.13	1.52	0.85	0.59	0.89	0.66
$M_{app,\bar{r}} \times 10^4$	1.48	1.50	1.56	1.43	1.44	1.42	1.54

使用双槽离心池能够求出离心池中溶质含量，则除在中点处可计算分子量外，还可求全部溶质的显示重均分子量 $\bar{M}_{w,app}$ (式 7-10)。这时 $C_b - C_m$ 是溶剂基线和溶质梯度曲线在 r_b 和 r_m 之间所包含的面积 (cm^2)。均一体系 $\bar{M}_{w,app} = M_{app,\bar{r}}$ ，不均一体系

$$\bar{M}_{w,app} > M_{app,\bar{r}}$$

用中点法测定分子量 计算 M_{app} , 同时计算 $\bar{M}_{w,app}$, 可以确证体系是否均一, 这是一个很好的方法。

四、有关用特殊溶剂做的实验

(一) 高浓度胍盐的水溶液

研究非共价结合的蛋白质亚基结构, 常常在 6M 或更高浓度的盐酸胍溶液中进行亚基总数和分子量测定。用这种溶剂作沉降分析实验时, 有几点要注意。首先是盐酸胍的纯度。6M 盐酸胍溶液的紫外吸收, 在 260nm 处 $A \leq 0.05$; 在 240—400nm 内, $A \approx 0.00$, 那末这批产品是纯品。如果有紫外吸收, 可用活性炭吸附并过滤, 滤液应无紫外吸收。用碳酸胍来合成盐酸胍或者进行重结晶亦不失为一个方法。配好的盐酸胍溶液, 蛋白质溶入后需充分透析, 一般至少二天。中间如果换透析液, 则从换液之日起再透析二天。

配制不同浓度的样品, 可先透析平衡一较浓的样品储备液, 然后用外透液稀释。操作时要避免液体蒸发, 因此在冷室内操作较好。用低速沉降平衡法测定分子量, 应先做合成界面实验, 不用的样品溶液应放在上部空间很小的容器内密闭保存。

盐酸胍水溶液的浓度和密度的关系, Kawahara 等^[34]曾详细研究过(见第十章)。6M 盐酸胍溶液的密度 $\rho = 1.143$ 。由于偏微比容和溶剂密度的变化, 实验时转速选在水溶液时的 1.3 倍左右。

离心力场中盐酸胍有一定浓度的分布。计算结果表明盐酸胍浓度为 6M, 液柱高 3mm, 转速 30,000rpm 时, 液面和液底密度差为 0.0023, 转速 10,000rpm 时为 0.0002。因此在沉降平衡实验选用的低速影响不大。

最重要的是偏微比容的测定。由于盐酸胍和蛋白质有一些作用, 实际上求到的是显示偏微比容 \bar{v}' 。计算分子量有关的 $(1 - \bar{v}'\rho)$ 项内, 由于 ρ 比较大, \bar{v}' 有 1% 误差, 将使分子量计算产生 8% 误差。

(二) 界面活性剂水溶液

界面活性剂和盐酸胍一样, 在求蛋白质亚基数和分子量时用得很多。界面活性剂的纯度也是重要的。最常用的硫酸十二烷基钠(SDS)市售商品由于碳氢链长度不一, 水溶液常呈乳浊, 这种试剂不适用于沉降平衡分析。如果不能得到纯品, 目前最好还是自己合成, 方法可参考 Emerson 等^[35]的文章。

蛋白质样品溶液要充分透析, 沉降平衡可按通常的实验方法进行。

沉降平衡实验结果分析, 和上述盐酸胍水溶液情况一样, 必须准确地求显示偏微比容 \bar{v}' 。界面活性剂和蛋白质很容易结合, \bar{v}' 和 \bar{v} 相差很大。

(三) 有机溶剂

溶于有机溶剂中的样品, 沉降分析实验时离心池材料必须耐该溶剂的腐蚀。在样品难于透析的情况下, 样品要先进行去离子, 干燥去水, 溶于有机溶剂的实验。

所得结果的分析, 仍然要注意显示偏微比容的测定。此外, 在无盐系统或者离子强度很低时, 还要验证蛋白质的电荷效应对显示分子量的影响。

第八章 Archibald 方法

离心过程中离心池内液柱两端的溶质既不流出也没有流入,净流量为零,即满足沉降平衡的条件。Archibald 方法就是利用这一点^[86],通过测定溶质浓度和液柱顶部的浓度与浓度梯度,或液柱底部的浓度与浓度梯度来计算溶质分子的分子量。它们之间的关系是

$$M = \frac{RT}{(1 - \bar{v}\rho)\omega^2} \cdot \frac{1}{r_m c_m} \left(\frac{dc}{dr} \right)_m \quad (8-1)$$

或

$$M = \frac{RT}{(1 - \bar{v}\rho)\omega^2} \cdot \frac{1}{r_b c_b} \left(\frac{dc}{dr} \right)_b \quad (8-2)$$

其中 M 是分子量, R 是气体常数, T 是绝对温度, \bar{v} 是溶质的偏微比容, ρ 是溶液的密度, ω 是角速度, r 是距轴心的距离, c 是浓度, m 、 b 分别表示液柱顶部和底部。

离心池中存在“坪区”的条件下, c_m 和 c_b 可用下式表达:

$$c_m = c_0 - \frac{1}{r_m^2} \int_{r_m}^{r_p} r^2 (dc/dr) dr \quad (8-3)$$

$$c_b = c_0 + \frac{1}{r_b^2} \int_{r_p}^{r_b} r^2 (dc/dr) dr \quad (8-4)$$

其中 c_0 是起始浓度。

Archibald 方法测定分子量的优点是离心时间很短,不到一个小时,计算根据沉降平衡同样的热力学方程式。它的最大缺点是分析数据取自液柱的两端,而这二端的有关信息最难测准。液面处 Schlieren 图象线条很宽,计算时需要外延去找液面位置的 Y 轴截距。如果液面位置外延选择正确的话,这个方法的结果高度准确。反之,如果选择不正确的话,将会产生巨大的差错。另一缺点是需要用合成界面池测定起始浓度,并且不适用于低浓度样品溶液分析。

对于肯定是单分散体系的样品来讲,从液面或液底都可测定分子量,得到的结果应相等,并且不随时间而变化。如果不是这样,那是由于样品溶液非理想性的影响。通常只测定液柱顶部,因为可以避免沉降物质堆积引起的复杂性,浓度梯度不那么陡,测定误差较小。

对于多分散体系,Archibald 方法测定的分子量是重均分子量,离心池内液柱顶部和底部测得的数值不同,并且随时间而变化,因为不同大小的分子按不同的沉降速度重新分布。

实 验 方 法

(一) 样品,光学系统,离心池

样品溶于稀缓冲液或盐溶液中,浓度 5mg/ml。采用 Schlieren 光学系统,双槽毛细管

型离心池。溶液槽加 FC-43 (氟碳油) 填底。

溶液槽	0.03ml FC-43
	0.12ml 样品溶液
溶剂槽	0.17ml 外透液

低速 (12000rpm 以下) 用 An-J 转头, 高速用 An-D 或 An-H 转头。

(二) 速度选择

如果知道样品分子量的范围, 可参阅图 7-2 选择离心速度。如果毫无信息则凭经验来选择速度。本法速度不那末严格, 有很大变动范围。合适的离心速度, 离心过程中有很长一段时间保持坪区。观察 Schlieren 图象, 离心池底部曲线过于陡峭, 以至于高过底片顶部, 表示转速太高。反之, 如果离心 45 分钟以后才能满足下述摄影要求, 则转速太低。

(三) 运转

待转头温度达到要求的温度 (通常在 15—20℃ 内) 时, 开始离心, 加速至所选速度。相差片角 70°, 待 Schlieren 图象液面处曲线高出基线 2—3mm 时拍第一张照片。这个高度可以用 Schlieren 图象上液柱的高度来估算 (后者一般为 6mm)。以后每隔 8 分钟拍摄一次, 直到中间的坪区消失为止。

(四) 起始浓度测定

小心从转头中取出上述离心池, 将注入孔朝上, 轻轻来回摇晃, 将溶液摇匀。注意勿使毛细管沾上液体。摇匀后, 把溶剂槽灌满溶剂 (预先平衡至实验所需温度)。把离心池放入转头内, 待温度平衡, 开始离心。加速至 8000—10,000rpm, 相差片角同平衡实验 (70°), 拍摄一次。以后待合成的 Schlieren 峰扩散成等边三角形时再拍一次。在这两次拍片之间可根据上述平衡实验拍片的时间、相同的相差片角, 拍摄相应的 Schlieren 峰照片。

(五) 计算

在平衡实验照片中选一张, 合成界面实验中也选一张相应的相片, 放在比长仪下计算。

测定合成界面实验 Schlieren 峰下的面积 (第 19 页), 此值相当于 c_{00} 。

平衡实验相片, 从液柱顶部开始沿水平方向各点读出 Schlieren 曲线垂直方向的读数, 即基线与 Schlieren 曲线的距离 (相当于 dc/dr)。开始时每隔 0.01cm (X 轴) 读一次, 以后每隔 0.02cm 读一次, 直至坪区。结果如表 8-1 所示。液面部分的最早几个读数, 由于 Schlieren 曲线并未伸入液面的影子中, 不能直接读出。所以在计算纸上以 dc/dr 对 r 作图, 作一光滑曲线外延至液面的位置。

[例] 实验数据见表 8-1。

$$(1 - \bar{v}\rho) = 0.308$$

转速 = 20,000rpm

温度 = 19.2℃

表 8-1 Archibald 方法测定分子量实验数据

编 号	X 标尺读数 (cm)	r(cm)	r ²	∂c/∂r(cm)	r ² (∂c/∂r)
1(液面)	13.975	6.687	44.716	0.2088*	—
2	13.985	6.691	44.769	0.1980*	8.864
3	14.005	6.701	44.903	0.1760*	7.903
4	14.025	6.710	45.024	0.1556	7.006
5	14.045	6.720	45.158	0.1338	6.042
6	14.065	6.730	45.293	0.1111	5.032
7	14.085	6.739	45.414	0.0897	4.074
8	14.105	6.749	45.549	0.0673	3.065
9	14.125	6.758	45.671	0.0520	2.375
10	14.145	6.768	45.806	0.0351	1.608
11	14.165	6.777	45.928	0.0231	1.061
12	14.185	6.787	46.063	0.0127	0.585
13	14.205	6.797	46.199	0.0051	0.236
14	14.225	6.806	46.322	0.0012	0.056
15	14.245	6.816	46.458	0	0

* 从 ∂c/∂r 对 r 作图上测定。

起始浓度 $c_0 = 0.713 \text{ cm}^2$

$r_m = 6.687$

$(\partial c / \partial r)_m = 0.2088 \text{ mm}$

放大倍数 $F = 2.095$

$\Delta x = 0.020$

由表 8-1

$$\sum_{r_m}^{r_p} r^2 (\partial c / \partial r) = 47.907$$

代入式 (8-3)

$$\begin{aligned} c_m &= c_0 - \frac{1}{r_m^2} \int_{r_m}^{r_p} r^2 \left(\frac{dc}{dr} \right) dr = c_0 - \frac{1}{r_m^2} \left(\frac{\Delta x}{F} \right) \sum_{r_m}^{r_p} r^2 \left(\frac{\partial c}{\partial r} \right) \\ &= 0.0713 - \frac{1}{44.716} \left(\frac{0.020}{2.095} \right) \times 47.907 = 0.0611 \end{aligned}$$

代入式 (8-1)

$$M = \frac{(8.313 \times 10^7) \times 292.4}{0.308 \times (4.387 \times 10^6)} \times \frac{0.2088}{6.687 \times 0.0611} = 9173 \times 10^3$$

同理,如果 Schlieren 曲线合适的话,可用式 (8-2)、式 (8-4) 从液柱底部计算分子量。

第九章 密度梯度平衡法测定分子量

和前面讲过的方法不同,密度梯度平衡法测定分子量时离心池中的样品处在一密度梯度介质中。离心池底部介质密度比样品密度大,离心一段时间后样品固定在和它本身密度相等的地方(图 9-1)。密度梯度超离心平衡分析将提供高分子的浮力密度、溶剂化、结构和化学组成的信息。

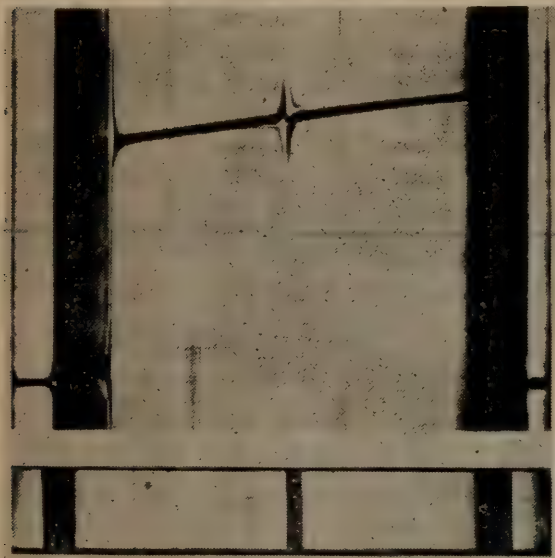


图 9-1

密度梯度平衡实验开始时离心池装满样品和一低分子量溶质的均匀水溶液或缓冲液。这个低分子量溶质即梯度物质。离心机以相当高的速度运转 24—48 小时直至达到平衡。离心过程中梯度物质重新分布,在离心池中形成一密度梯度。样品粒子浓缩成一条或几条区带(有几个成分的话),它(们)的位置是梯度中相当于它们的密度的位置。根据沉降-扩散平衡理论,梯度物质在离心池中的分布可以由它的起始浓度、分子量和活度系数来决定。梯度溶液因压缩而密度增加,通常是极小的,因此得到的是大气压下大分子的浮力密度值。这里浮力

密度是指溶剂化粒子的密度,可能是所用的梯度介质的一个特性。因此在两种不同的介质中测到的密度可能不同。如果粒子具有渗透性,则不同浓度时即使是同一介质中测得的密度也会不同。

样品区带的宽度取决于几个因素,它是梯度陡度的一个函数,因而也就是取决于起始浓度和转速以及大分子的物理性质。在固定实验条件下,区带宽度取决于样品粒子密度的不均一度和它的扩散速度。扩散速度和粒子的大小成反比例。因此样品如果密度均一,可以从区带宽度测定分子量。事实上用这个方法测定核酸或病毒的分子量带有一定风险,因为不容易区别区带宽度是由于扩散引起还是不均一或者其他复杂因素引起的。理论上测定分子量需要知道“有效的”密度梯度,这个量既考虑了溶剂化大分子的密度变化,也考虑了密度梯度的压缩性,但是这个量很难精确赋值。下面只介绍一种最简单的实验步骤,得到的结果是一个很好的大分子分子量近似值。

对合适的梯度物质的要求是很苛刻的,只有很少物质符合生物物质测定的要求。梯度物质必须溶解度大,配成的溶液有足够高的密度,不和样品起反应(不包括溶剂化),本身非常稳定,一般来讲在紫外区应无吸收。有时还要求梯度物质对样品不能有不良的渗透压效应。最常用的两种梯度物质是蔗糖和氯化铯。蔗糖价格低廉,渗透压效应小,缺点

表 9-1 20℃ 蔗糖(分子量 342)的密度、折射率和浓度数据

密度 (g/cm ³)	折射率, n_D	重量百分比(%)	溶液 (mg/ml)*	克分子浓度
0.9982	1.3330	0	0	0
1.0021	1.3344	1	10.0	0.029
1.0060	1.3359	2	20.1	0.059
1.0099	1.3374	3	30.3	0.089
1.0139	1.3388	4	40.6	0.119
1.0179	1.3403	5	50.9	0.149
1.0219	1.3418	6	61.3	0.179
1.0259	1.3433	7	71.8	0.210
1.0299	1.3448	8	82.4	0.241
1.0340	1.3464	9	93.1	0.272
1.0381	1.3479	10	103.8	0.303
1.0423	1.3494	11	114.7	0.335
1.0465	1.3510	12	125.6	0.367
1.0507	1.3526	13	136.6	0.399
1.0549	1.3541	14	147.7	0.431
1.0592	1.3557	15	158.9	0.464
1.0635	1.3573	16	170.2	0.497
1.0678	1.3590	17	181.5	0.530
1.0721	1.3606	18	193.0	0.564
1.0765	1.3622	19	204.5	0.597
1.0810	1.3639	20	216.2	0.632
1.0854	1.3655	21	227.9	0.666
1.0899	1.3672	22	239.8	0.701
1.0944	1.3689	23	251.7	0.735
1.0990	1.3706	24	263.8	0.771
1.1036	1.3723	25	275.9	0.806
1.1082	1.3740	26	288.1	0.842
1.1128	1.3758	27	300.5	0.878
1.1175	1.3775	28	312.9	0.914
1.1222	1.3793	29	325.4	0.951
1.1270	1.3811	30	338.1	0.988
1.1318	1.3829	31	350.9	1.025
1.1366	1.3847	32	363.7	1.063
1.1415	1.3865	33	376.7	1.100
1.1463	1.3883	34	389.7	1.138
1.1513	1.3902	35	403.0	1.177
1.1562	1.3920	36	416.2	1.216
1.1612	1.3939	37	429.6	1.255
1.1663	1.3958	38	443.2	1.295
1.1713	1.3978	39	456.8	1.334
1.1764	1.3997	40	470.6	1.375
1.1816	1.4016	41	484.5	1.415
1.1868	1.4036	42	498.5	1.456
1.1920	1.4056	43	512.6	1.498
1.1972	1.4076	44	526.8	1.539

续表 9-1

密度 (g/cm ³)	折射率, n_D	重量百分比(%)	溶液 (mg/ml)*	克分子浓度
1.2025	1.4096	45	541.1	1.581
1.2079	1.4117	46	555.6	1.623
1.2132	1.4137	47	570.2	1.666
1.2186	1.4158	48	584.9	1.709
1.2241	1.4179	49	599.8	1.752
1.2296	1.4200	50	614.8	1.796
1.2351	1.4221	51	629.9	1.840
1.2406	1.4242	52	645.1	1.885
1.2462	1.4264	53	660.5	1.930
1.2519	1.4285	54	676.0	1.975
1.2575	1.5307	55	691.6	2.020
1.2672	1.4329	56	707.4	2.067
1.2690	1.4351	57	727.3	2.113
1.2748	1.4373	58	739.4	2.160
1.2806	1.4396	59	755.6	2.207
1.2865	1.4418	60	771.9	2.255
1.2924	1.4441	61	788.3	2.303
1.2983	1.4464	62	804.9	2.351
1.3043	1.4486	63	821.7	2.401
1.3103	1.4509	64	838.6	2.450
1.3163	1.4532	65	855.6	2.500
1.3224	1.4558	66	872.8	2.550
1.3286	1.4581	67	890.2	2.664

* 除 10 得容量百分数 % (W/v)。

是密度小, 最高密度只有 1.3g/cm^3 , 浓溶液非常粘。由于蔗糖的粘度特别大, 通常预先制成梯度备用。氯化铯密度可高达 1.9g/cm^3 , 但是相当贵, 溶液对铝制转头和离心池有腐蚀。用于核酸测定时, 铯离子代替了常用的配对离子钠离子, 因此实际研究的是核酸的铯盐。不纯的氯化铯, 溶液强烈吸收紫外光, 所以只有经过精制的光学级的氯化铯才可以用。

密度梯度溶液可以称重配制, 或者配成溶液后测定它的折射率换算成浓度。表 9-1 是蔗糖水溶液的密度、折射率和浓度之间的关系。表 9-2 是氯化铯溶液的有关数据。必须注意在文献中有些工作者用重量百分数表示浓度, 而另一些工作者以容量百分数表示, 从表 9-1 和表 9-2 可以看出, 这两种方式表达溶液浓度时, 它们的数值差是不可忽略的。

用氯化铯溶液作密度梯度实验, 温度常选 25°C , 因为这个盐的许多物理性质数据都是在这个温度下测定的。

密度梯度离心技术的一个突出优点是只需要很少量样品。例如只要几个微克的核酸就可测定它的浮力密度。密度梯度离心技术主要用于测定非常大的溶质粒子, 例如核酸和病毒的分子量, 因为平衡时区带宽度和分子量成反比。例如在 $56,000\text{rpm}$ 时, 溶菌酶 (分子量 11700) 的区带宽度超过 1cm , 这是最小可测分子量。显然有几个组分并存时, 密度梯度离心技术的分辨率远较常规的方法低, 不过对于研究蛋白质的溶剂化, 这个技术

表 9-2 25℃ 氯化铯(分子量 168.27) 的密度、折射率和浓度数据

密度 (g/cm ³)	折射率, n_D^{25}	重量百分比(%)	溶液* ¹ (mg/ml)	克分子浓度
1.0047	1.3333	1	10.0	0.056
1.0125	1.3340	2	20.2	0.119
1.0204	1.3348	3	30.6	0.182
1.0284	1.3356	4	41.1	0.244
1.0365	1.3364	5	51.8	0.308
1.0447	1.3372	6	62.8	0.373
1.0531	1.3380	7	73.7	0.438
1.0615	1.3388	8	84.9	0.504
1.0700	1.3397	9	96.3	0.572
1.0788	1.3405	10	107.9	0.641
1.0877	1.3414	11	119.6	0.710
1.0967	1.3423	12	131.6	0.782
1.1059	1.3432	13	143.8	0.854
1.1151	1.3441	14	156.1	0.927
1.1245	1.3450	15	168.7	1.002
1.1340	1.3459	16	181.4	1.077
1.1437	1.3468	17	194.4	1.155
1.1536	1.3478	18	207.6	1.233
1.1637	1.3488	19	221.1	1.313
1.1739	1.3498	20	234.8	1.395
1.1843	1.3508	21	248.7	1.477
1.1948	1.3518	22	262.9	1.561
1.2055	1.3529	23	277.3	1.647
1.2164	1.3539	24	291.9	1.734
1.2275	1.3550	25	306.9	1.823
1.2387	1.3561	26	322.1	1.913
1.2502	1.3572	27	337.6	2.005
1.2619	1.3584	28	353.3	2.098
1.2738	1.3596	29	369.4	2.194
1.2858	1.3607	30	385.7	2.291
1.298	1.3619	31	402.4	2.390
1.311	1.3631	32	419.5	2.492
1.324	1.3644	33	436.9	2.595
1.336	1.3657	34	454.2	2.698
1.3496	1.3670	35	472.4	2.806
1.363	1.3683	36	490.7	2.914
1.377	1.3696	37	509.5	3.026
1.391	1.3709	38	528.6	3.140
1.406	1.3722	39	548.3	3.257
1.4196	1.3735	40	567.8	3.372
1.435	1.3750	41	588.4	3.495
1.450	1.3764	42	609.0	3.617
1.465	1.3778	43	630.0	3.742
1.481	1.3792	44	651.6	3.870
1.4969	1.3807	45	673.6	4.001

续表 9-2

密度 (g/cm ³)	折射率, n_D^{*1}	重量百分比(%)	溶液 ^{*2} (mg/ml)	克分子浓度
1.513	1.3822	46	696.0	4.134
1.529	1.3837	47	718.6	4.268
1.546	1.3852	48	742.1	4.408
1.564	1.3868	49	766.4	4.552
1.5825	1.3885	50	791.3	4.700
1.601	1.3903	51	816.5	4.849
1.619	1.3920	52	841.9	5.000
1.638	1.3937	53	868.1	5.156
1.658	1.3955	54	895.3	5.317
1.6778	1.3973	55	922.8	5.481
1.699	1.3992	56	951.4	5.651
1.720	1.4012	57	980.4	5.823
1.741	1.4032	58	1009.8	5.998
1.763	1.4052	59	1040.2	6.178
1.7846	1.4072	60	1070.8	6.360
1.808	1.4093	61	1102.9	6.550
1.831	1.4115	62	1135.8	6.746
1.856	1.4137	63	1167.3	6.945
1.880	1.4160	64	1203.2	7.146
1.9052	1.4183	65	1238.4	7.355

*1 密度在 1.00—1.38 之间,按下列关系式计算密度:

$$\rho^{23} = 10.2402n_D^{23} - 12.6483$$

密度高于 1.37,按下式计算密度:

$$\rho^{23} = 10.8601n_D^{23} - 13.4974$$

*2 除 10.0 得容量百分数% (W/v)。

是很有用的。

由于样品溶液浓度非常低,光学系统总是选择紫外光吸收法。浓盐溶液,如氯化铯浓溶液的密度梯度,类似一个稜镜,会使透过离心池的光线偏折。在极端的场合下,甚至使光偏出照相镜,因此一部分甚至整个离心池不在底片上曝光。为此,采用负 1° 或 2° 的楔形池窗予以补偿。

实 验 方 法

(一) 样品、离心池、光学系统

采用紫外吸收光学系统、双槽离心池、碳粉充填池芯,下池窗用平面石英片,上池窗用负 1° 楔形石英窗。

溶剂槽 56% (W/W) 氯化铯缓冲溶剂 (5.65M CsCl, 比重 1.70g/cm³) 0.7ml

溶液槽 5μg/ml DNA 溶液(溶于上述溶剂) 0.0—0.02 0.7ml

(二) 运转条件

25°C, 44,000rpm 旋转 16 小时后开始记录并扫描。 如有单色仪波长选用 265nm。

每隔 2 小时观察一次,直至峰高不再变化为止,表示已经达到平衡。如果没有峰出现,表示样品溶液浓度不够,或者没有选对密度梯度范围。从现在选择的上述实验条件,平衡时离心池顶部密度为 1.65g/cm³,底部密度为 1.75g/cm³。因为 DNA 密度在 1.7g/cm³ 左右,所以不会有这个问题。至于未知样品就要用一系列不同浓度的氯化铯溶液来做实验。一个快速选择密度梯度的方案是,先用 5 倍上述样品浓度 (0.0—0.1) 的 1.4g/cm³ 氯化铯溶液做实验,离心后前几个小时内每隔 16 分钟观察一次。如果在液面有一界面沉降,同时在液底有一界面上浮,表示离心池中密度梯度选对了。如果只有沉降界面,表示密度太低。反之,如果只有上浮界面,表示密度太高。如是反复实验可以找到合适的密度梯度。

(三) 计算

浮力密度 ρ_s 按式 (9-1) 计算

$$\rho_s = \rho_c + \left(\frac{d\rho}{dr}\right)_{r_c} (r_s - r_c) \tag{9-1}$$

其中 ρ_c 是离心池中的等浓度点,即这 r_c 点处梯度的浓度等于起始浓度, $\rho_c = \rho_0$ 。而

$$r_c = \sqrt{\frac{r_m^2 + r_b^2}{2}} \tag{9-2}$$

其中 r_m , r_b 分别为液面和液底离轴心的距离。式 (9-1) 中 r_s 为样品区带峰顶距轴心的距离, $\left(\frac{d\rho}{dr}\right)_{r_c}$ 由式 (9-3) 计算。

$$\left(\frac{d\rho}{dr}\right)_{r_c} = \frac{\omega^2 r_c}{\beta} \tag{9-3}$$

β 是一个因子^[37],它的定义是 $\frac{RT}{(1 - \bar{v}\rho)M} \left(\frac{d \ln a}{d\rho}\right)$ 。氯化铯溶液中不同的 ρ 的 β 值见表 9-3。在本例中 $\rho_0 = 1.70$,故 $\beta = 1.19 \times 10^9$ 。

分子量测定需要假定大分子区带呈 Gaussian 曲线分布。从分布曲线的标准偏差 σ 来

表 9-3 25℃ 下不同密度氯化铯溶液的 β 值

密度 (g/cm ³)	β	1/ β
1.15	2.491×10^9	0.4014×10^{-9}
1.20	1.984	0.5040
1.25	1.715	0.5831
1.30	1.546	0.6468
1.35	1.430	0.6993
1.40	1.346	0.7429
1.45	1.286	0.7776
1.50	1.245	0.8032
1.55	1.216	0.8224
1.60	1.197	0.8254
1.65	1.190	0.8403
1.70	1.190	0.8403
1.75	1.199	0.8340
1.80	1.215	0.8230
1.85	1.236	0.0891

计算。如图 9-2 所示,画一条基线,测量峰高,在峰高的 0.607 处测量峰宽。这个峰宽值相当于 2σ 乘放大倍数 F 。将 σ 代入式 (9-4), 计算显示分子量 M_{app}

$$M_{app} = \frac{RT\rho_s}{\sigma^2 \omega^2 r_s \left(\frac{d\rho}{dr} \right)_{r_s}} \quad (9-4)$$

所得的值是溶剂化分子的分子量。

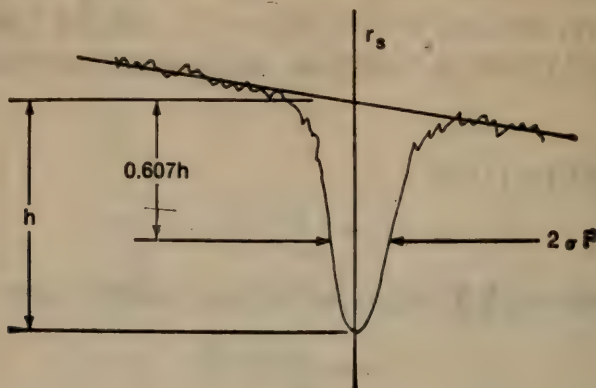


图 9-2

第十章 离心分析技术必须的辅助测定

一、密 度

几乎所有的离心分析技术都需要知道离心池中溶液的密度 ρ 。测定分子量时要使测定值误差小于 1%，样品密度测定值必须准确至 0.3% 以内。密度测定虽然可以用密度计来做，不过常用的还是 10—25ml 比重瓶测定高分子稀溶液的密度。高分子的稀溶液和纯溶剂比较，因溶入溶质而引起的密度变化非常小，除特别精确测定外，几乎都把纯溶剂的密度代替，以节约样品量。一些常用的溶剂密度见表 10-1 和图 10-1。

即使要精确值也可以用溶剂的密度来计算溶液的密度。计算公式见式 (10-1)，一些计算结果见表 10-2。

$$\rho_{\text{溶液}} = \rho_{\text{溶剂}} + c(1 - \rho_{\text{溶剂}}\bar{v}) \tag{10-1}$$

其中 c 是浓度， \bar{v} 是溶质的偏微比容。

表 10-1 水的密度 $\rho_{t,w}$ 和盐溶液的 $\Delta\rho$ 与 η_t/η_w , $\rho_t = \rho_{t,w} + \Delta\rho$

(a) 水的密度								
温度(°C)		$\rho_{t,w}(\text{g/cm}^3)$		温度(°C)		$\rho_{t,w}(\text{g/cm}^3)$		
0		0.9999		22		0.9978		
5		1.0000		24		0.9973		
10		0.9997		26		0.9968		
15		0.9991		28		0.9963		
16		0.9990		30		0.9957		
18		0.9986		32		0.9954		
20		0.9982		34		0.9951		

(b) 盐溶液的 $\Delta\rho$ 和 η_t/η_w								
盐	克分子浓度 (M)	$\Delta\rho(\text{g/cm}^3)$				η_t/η_w		
		20°	25°	30°	40°	20°	30°	40°
NaCl	0.10	0.0041	0.0041	0.0041	0.0040	1.009	1.009	1.010
	0.20	0.0083	0.0082	0.0081	0.0080	1.017	1.019	1.021
	0.50	0.0204	0.0202	0.0200	0.0196	1.042	1.049	1.054
	1.00	0.0403	0.0399	0.0395	0.0389	1.089	1.101	1.111
	2.00	0.0788	0.0780	0.0774	0.0763	1.208	1.225	1.241
	3.00	0.1160	0.1149	0.1140	0.1127	1.366	1.382	1.397
KCl	0.1	0.0030				0.994		
	0.2	0.0079				0.991		
KH ₂ PO ₄	0.01		0.0010			1.003		
	0.10		0.0098			1.029		
	0.20		0.0193			1.058		
	0.50		0.0469			—		

续表 10-1

盐	克分子浓度 (M)	$\Delta\rho(\text{g/cm}^3)$				$\eta_s/\eta_{s,w}$		
		20°	25°	30°	40°	20°	30°	40°
Na_2HPO_4	0.01		0.0014				1.007	
	0.10		0.0141				1.066	
	0.20		0.0281				1.132	
NaH_2PO_4	0.01	0.0008				1.003		
	0.10	0.0079				1.030		
	0.20	0.0158				1.061		
	0.50	0.0404				1.182		
	1.00	0.0789				1.409		
CH_3COOH	0.01	0.0000				1.001		
	0.10	0.0008		0.0008	0.0005	1.012		
	0.20	0.0018		0.0017	0.0015	1.023		
	0.50	0.0043		0.0040	0.0036	1.057		
	1.00	0.0086		0.0079	0.0071	1.119		
	2.00	0.0168		0.0154	0.0140	1.257		
	3.00	—		—	—	1.418		
CH_3COONa	0.01	0.0004				1.004		
	0.10	0.0043				1.036		
	0.20	0.0086				1.073		
Na_2CO_3	0.01	0.0011		—	—	1.005		
	0.10	0.0109		0.0106	0.0106	1.409		
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	0.01			0.0019			1.009	
	0.10			0.0187			1.086	
柠檬酸钠	0.01	0.0020				1.010		
	0.10	0.0195				1.101		
	0.20	0.0382				1.209		

表 10-2 溶剂密度接近 1.0g/cm^3 , 20°C 时溶液密度随溶液浓度的变化

溶质的 $\bar{v}(\text{cm}^3/\text{g})$	浓度 (mg/ml)	密度增量 (g/cm^3)
0.700	0.1	0.00003
	1.0	0.0003
	5.0	0.0015
	10.0	0.0030
0.725	0.1	0.00003
	1.0	0.0003
	5.0	0.0014
	10.0	0.0027
0.750	0.1	0.00003
	1.0	0.0003
	5.0	0.0013
	10.0	0.0025

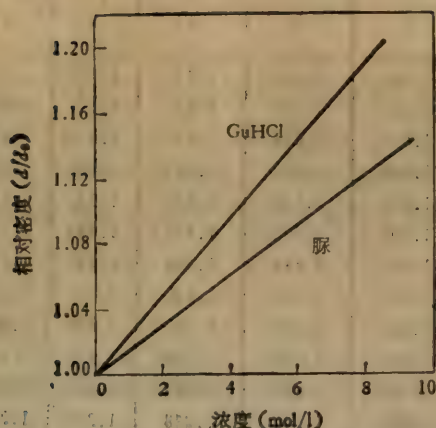


图 10-1 脲, 盐酸胍溶液的相对密度由于温度依存性小, 可在 15—30℃ 范围内使用。

二、粘 度

沉降系数、扩散系数换算成标准状态, 必须知道溶液的粘度。和密度情况一样, 在许多场合, 特别是无限稀释的溶液, 以溶剂的粘度值代替溶液的粘度, 误差极小, 可忽略不计。粘度一般用毛细管粘度计测定, 如 Ubbelohde 粘度计(图 10-2)。因为沉降分析计算中只需要测定溶液对水的相对粘度, 因此只要知道定量溶液和水在粘度计中流过时间之比, 此值直接可代入计算。一些浓度不同的盐溶液的相对粘度见表 10-1 和图 10-3。水的粘度随温度的变化很大, 因此即使是稀溶液, $\eta_t/\eta_{t,w}$ 这一项也要做一校正(表 10-3)。

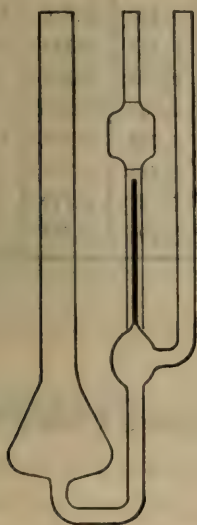


图 10-2 Ubbelohde

粘度计

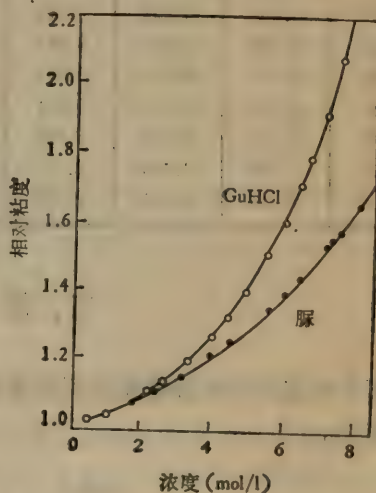


图 10-3 脲, 盐酸胍溶液的相对粘度 η/η_0 , 25℃ 测定值

表 10-3 不同温度水的粘度和 20℃ 水粘度的比值 ($\eta_i/\eta_{20,w}$)

温度 (°C)	.0	.1	.2	.3	.4	.5	.6	.7	.8	.9
0	1.778	1.772	1.766	1.760	1.754	1.747	1.741	1.735	1.729	1.723
1	1.717	1.711	1.705	1.700	1.694	1.688	1.682	1.676	1.671	1.665
2	1.659	1.653	1.648	1.643	1.637	1.632	1.627	1.621	1.616	1.610
3	1.605	1.600	1.595	1.590	1.585	1.580	1.574	1.569	1.564	1.559
4	1.554	1.549	1.544	1.538	1.534	1.530	1.525	1.520	1.515	1.510
5	1.505	1.501	1.496	1.492	1.487	1.483	1.478	1.474	1.469	1.465
6	1.460	1.456	1.451	1.447	1.442	1.438	1.434	1.429	1.425	1.420
7	1.416	1.412	1.408	1.404	1.400	1.396	1.391	1.387	1.383	1.379
8	1.375	1.371	1.367	1.363	1.359	1.356	1.352	1.348	1.344	1.340
9	1.336	1.332	1.328	1.324	1.320	1.317	1.313	1.309	1.305	1.302
10	1.298	1.294	1.291	1.287	1.284	1.280	1.276	1.273	1.269	1.266
11	1.262	1.259	1.255	1.252	1.248	1.245	1.242	1.238	1.235	1.231
12	1.228	1.225	1.221	1.218	1.215	1.211	1.208	1.205	1.201	1.198
13	1.195	1.192	1.189	1.185	1.182	1.179	1.176	1.173	1.170	1.167
14	1.165	1.162	1.159	1.156	1.153	1.150	1.147	1.144	1.141	1.138
15	1.135	1.132	1.129	1.126	1.123	1.120	1.118	1.115	1.112	1.109
16	1.106	1.103	1.100	1.098	1.095	1.092	1.089	1.087	1.084	1.081
17	1.078	1.075	1.073	1.070	1.067	1.065	1.062	1.059	1.057	1.054
18	1.051	1.049	1.046	1.043	1.041	1.038	1.036	1.033	1.030	1.028
19	1.025	1.023	1.020	1.018	1.015	1.013	1.010	1.008	1.005	1.003
20	1.000	0.998	0.995	0.993	0.990	0.988	0.986	0.983	0.981	0.978
21	0.976	0.974	0.971	0.969	0.967	0.964	0.962	0.960	0.957	0.955
22	0.953	0.950	0.948	0.946	0.944	0.941	0.939	0.937	0.934	0.932
23	0.930	0.928	0.926	0.923	0.921	0.919	0.917	0.915	0.913	0.910
24	0.908	0.906	0.904	0.902	0.900	0.898	0.896	0.894	0.891	0.889
25	0.887	0.885	0.883	0.881	0.879	0.877	0.875	0.873	0.871	0.869
26	0.867	0.865	0.863	0.861	0.859	0.857	0.856	0.854	0.852	0.850
27	0.848	0.846	0.844	0.842	0.840	0.838	0.837	0.835	0.833	0.831
28	0.829	0.827	0.826	0.824	0.822	0.820	0.818	0.816	0.815	0.813
29	0.811	0.809	0.808	0.806	0.804	0.802	0.801	0.799	0.797	0.795
30	0.794	0.792	0.790	0.788	0.787	0.785	0.783	0.782	0.780	0.778
31	0.777	0.775	0.773	0.772	0.770	0.769	0.767	0.765	0.764	0.762
32	0.760	0.759	0.757	0.756	0.754	0.753	0.751	0.749	0.748	0.746
33	0.745	0.743	0.742	0.740	0.739	0.737	0.736	0.734	0.732	0.731
34	0.729	0.728	0.726	0.725	0.724	0.722	0.721	0.719	0.718	0.716
35	0.715	0.713	0.712	0.710	0.709	0.708	0.706	0.705	0.703	0.702

三、偏 微 比 容

几乎所有的沉降分析都需要用到偏微比容 \bar{v} 。偏微比容的定义是溶质溶于溶剂中产生的体积变化。

$$\bar{v} = \left(\frac{\partial \bar{v}}{\partial g_i} \right)_{T,P,j}, \quad i \neq j$$

由于溶质的流体力学性质取决于 $(1 - \bar{v}\rho)$ ，偏微比容数值的准确性有可能对沉降分析结

果产生很大影响。例如沉降-扩散法测定分子量, \bar{v} 有 0.3% 误差, 计算结果误差为 1% ($\rho \sim 1$)。决定偏微比容的因素有温度和溶剂化作用。溶剂化作用对稀溶液中的绝大多数蛋白质的影响很小, 但是在某些溶液, 例如高浓度的去污剂或氯化铯溶液作用非常复杂。Casassa 和 Eisenberg^[9] 研究了多组分体系的偏微容积的热力学性质, 表明对混合溶液透折平衡的多组分溶液可以得到显示比容的真实值。沉降平衡实验中采用这些显示值, 可避免理论上溶剂相互作用处理的困难而得到正确的非溶剂化分子量。

鉴于偏微比容的重要性, 有许多方法被用来测定这个数值, 但是没有一个方法是完全令人满意的。下面列举了一些方法。

(一) 从实验结果来估算

绝大部分蛋白质的偏微比容数值接近, 例如 McMeekin 和 Marshall^[38] 测定了一系列蛋白质的偏微比容大约都是 0.75。因此可以假设一个值, 用来计算分子量。这时报道的结果应列出分子量与浮力因子 ($1 - \bar{v}\rho$) 即 $M(1 - \bar{v}\rho)$, 以表示分子量计算时用的 \bar{v} 是一个假设值。

表 10-4 列出了一些核酸的偏微比容值供参考。

表 10-4 DNA 和 RNA 的偏微比容

核 酸	$\bar{v}(\text{ml/g})$
DNA ^{*1}	
Cs DNA	0.479
Rb DNA	0.516
Na DNA	0.556
Li DNA	0.561
K DNA	0.562
NH ₄ DNA	0.613
RNA	
Na RNA	0.57±0.02 ^{*2} 0.53 ^{*3}

^{*1} J. E. Hearst, *J. Mol. Biol.* **4**, 415 (1962).
^{*2} P. Doty, H. Boedtkan, J. R. Fresco, R. Hoselkorn, M. Litti, *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* **45**, 482 (1959).
^{*3} J. H. Strauss, R. L. Sinsheimer, *J. Mol. Biol.* **7**, 43 (1963).

(二) 根据氨基酸分析

知道蛋白质的氨基酸组成, 可以根据氨基酸的偏微比容来计算蛋白质的偏微比容。Edsall 等^[39]测定的氨基酸残基偏微比容见表 10-5。用这个方法计算偏微比容较上述(一)法为佳。不过有些因素如蛋白质的主体结构对偏微比容的影响被忽略。对于某些结构蛋白计算数值可能不太正确。

表 10-5 氨基酸残基的比容

氨基酸	氨基酸残基比容, v_i	核 糖 核 酸 酶		
		氨基酸残基数/分子	氨基酸残基重量(%) (W_i)	$v_i W_i$
甘氨酸	0.64	3	1.25	0.80
丙氨酸	0.74	12	6.12	4.53
丝氨酸	0.63	15	9.44	5.95
苏氨酸	0.70	10	7.56	5.29
缬氨酸	0.86	9	6.27	5.48
亮氨酸	0.90	2	1.74	1.57
异亮氨酸	0.90	3	2.30	2.07
脯氨酸	0.76	5	3.32	2.52
羟脯氨酸	0.68	—	—	—
甲硫氨酸	0.75	4	3.52	2.64
胱氨酸	0.61	—	—	—
半胱氨酸	0.70	8	5.95	4.17
色氨酸	0.74	—	—	—
酪氨酸	0.71	6	6.84	4.86
组氨酸	0.67	4	3.73	2.50
精氨酸	0.70	4	4.43	3.10
赖氨酸	0.82	10	9.22	7.56
天冬氨酸	0.59	7	5.69	3.36
天冬酰胺	0.60	9	7.31	4.39
谷氨酸	0.66	4	3.63	2.40
羟谷氨酸	0.60	—	—	—
谷氨酰胺	0.67	8	7.27	4.87
苯丙氨酸	0.76	3	3.13	2.38

总数 126 ΣW_i 98.82 $\Sigma v_i W_i$ 170.44

$$\bar{v} = \frac{\Sigma v_i W_i}{\Sigma W_i} = 0.713 \text{ ml/g}$$

(三) 用比重瓶测定

这是最常用的方法。称量比重瓶中溶液的质量根据式 (10-2) 计算偏微比容

$$1 - \bar{v}\rho = (1 - W) \left(\frac{1}{A} \right) \left(\frac{dA}{dW} \right) \quad (10-2)$$

其中 A 是比重瓶中溶液的质量, W 是溶质的重量百分数, ρ 是溶液的密度。以 A 对 W 作图, 斜率为 dA/dW 。 \bar{v} 随浓度变化, 用 $W \rightarrow 0$ 时的 dA/dW 计算 $1 - v_0\rho_0$ (ρ_0 是溶剂的密度) 如果 \bar{v} 不随浓度变化, 则可用显示偏微比容 \bar{v}_a 来代替

$$\bar{v}_a = [\nu - (1 - W)v_0]/W \quad (10-3)$$

其中 $\nu = \frac{1}{\rho}$, 是溶液的比容, $v_0 = \frac{1}{\rho_0}$, 是溶剂的比容。可见, 只要在一个溶质浓度测定就可计算 \bar{v}_a 。在式 (10-3) 中, W 代表非溶剂化溶质, 这对 \bar{v} 也是一样。

用本法测定偏微比容, 需要相对来讲大量的样品, 溶液密度测定必须十分准确。对蛋白质来讲, 要使 \bar{v} 的数值正确至 $\pm 0.002 \text{ ml/g}$, 1% 浓度溶液密度必须准确至小数点后第五位上 ± 2 。这就是说, 用 10ml 比重瓶时要准确称量至 $\pm 0.2 \text{ mg}$ 。溶质浓度必须准确至

±0.07mg/ml。

(四) 沉降平衡法测定

这是一种和上述不同的做法，是在一系列不断增加密度的溶剂中进行沉降平衡测定分子量，得到 $M(1 - \bar{v}\rho)$ ，同时计算 M 和 $\bar{v}^{[40]}$ 。本法的前提是溶剂和溶质的相互作用不因密度增加而增加，所以溶剂局限于那些含 H 和 O 的重同位素的水。

在两个成分的体系中(水-蛋白质，但是含有不和蛋白质结合的盐类)，溶剂是 H_2O 和 D_2O 。根据沉降平衡法

$$M_2(1 - \bar{v}\rho_{H_2O}) = \frac{2RT}{\omega^2} \left(\frac{d \ln c}{dr^2} \right)_{H_2O} \quad (10-4)$$

$$kM_2 \left(1 - \frac{\bar{v}}{k} \rho_{D_2O} \right) = \frac{2RT}{\omega^2} \left(\frac{d \ln c}{dr^2} \right)_{D_2O} \quad (10-5)$$

其中 M_2 是蛋白质的分子量， k 是 D 置换 H 前后蛋白质分子量之比。从式 (10-4) 和式 (10-5)

$$\bar{v} = \frac{k - \phi}{\rho_{D_2O} - \phi \rho_{H_2O}} \quad (10-6)$$

其中：

$$\phi = \frac{(d \ln c / dr^2)_{D_2O}}{(d \ln c / dr^2)_{H_2O}} \quad (10-7)$$

经重水交换的蛋白质肽链上的胺基氢以及赖氨酸侧链 N，半胱氨酸的 S 和丝氨酸的 O 上结合的氢均被氘置换。一般来讲， k 值与蛋白质种类关系不大，大致有一定值：1.0155。至于溶剂若不是 100%， k 值可按比例折算。例如等量混和 ($H_2O:D_2O = 1:1$)， $k = 1.0775$ 。

【例】兔肌醛缩酶的测定^[41]

实验条件：醛缩酶溶于 0.1M 磷酸钠缓冲液，

pH(pD) = 7, 20°C，

起始浓度 0.2mg/ml，转速 20,000rpm，用高速沉降平衡法，记录用紫外扫描，测量 280nm 吸收。结果如图 10.4 所示，以斜率 $(d \ln c / dr^2)$ 代入式 (10-4) 和式 (10-5) 得：

$$M_2(1 - \bar{v}\rho_{H_2O}) = 38200 \pm 600$$

$$kM_2 \left(1 - \frac{\bar{v}}{k} \rho_{D_2O} \right) = 28600 \pm 600$$

$\rho_{H_2O} = 1.013$ ， $\rho_{D_2O} = 1.118$ ， $k = 1.0155$ 。从式 (10-6)

$$\bar{v} = 0.742 \pm 0.005$$

代入

$$M = 154,000 \pm 2000$$

这和其他方法测定的数值一致。

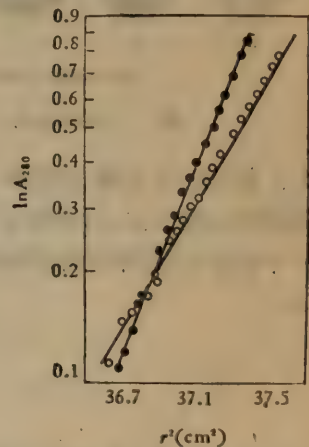


图 10-4 $\ln A_{280}$ 对 r^2 作图。0.1M 磷酸缓冲液 ● pD7, ○ pH7。

附录 制备超离心技术

离心机是一种把溶液中的粒子分离出来的仪器。制备超离心技术和分析超离心技术的区别,在于前者的目的是分离出一些“专门的”粒子,后者还包括对这些沉降粒子物理性质的测定。从生物学方面来讲,“专门的”粒子通常指的是细胞、亚细胞组织或生物高分子。

制备超离心技术包括两种方法:一种是分级离心法,另一种是密度梯度离心法。

一、分级离心法

一个非均一的粒子悬浮液在离心机中离心时,各种粒子以各自的沉降速度移向离心

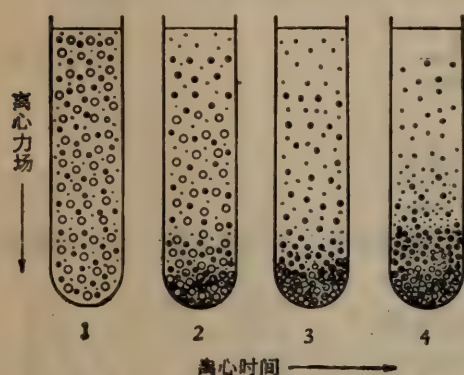


图1 分级离心法

管底部,逐步在底部形成一层沉淀物质。这层沉淀物质含有各种组分,但是最多的是那些沉降最快的组分(见图1)。为了分出某一特定组分,需要进行一系列离心。通常先选择一个离心速度和离心时间,第一次离心时把大部分不需要的更大粒子沉降去掉。这时所需要的组分大部分仍留在上清液内。然后将收集到的上清液用更高的转速离心,把需要的粒子沉积下来。离心时间要选择得当,使大部分不需要的更小粒子仍留在上清液中。接着是把沉淀悬浮起来,再一次用较低转速

离心。如此反复高速、低速离心,直至达到所需粒子的纯度为止。这种基于粒子沉降速度不同而分离的方法,用得非常普遍,对病毒和亚细胞组分的浓缩特别有用。但是用它得不到一个纯组分(那个沉降最慢的组分除外),不过即使那个最慢沉降组分,它的得率也是很低的。

二、密度梯度离心法

密度梯度离心法较分级离心法复杂,但是它具有很好的分辨能力。密度梯度离心可以同时使样品中几个或全部组分分离,这是分级离心法所不及的。顾名思义,这个方法是把样品粒子在一个密度梯度介质中离心。这个介质由一合适的小分子和样品粒子可在其中悬浮的溶剂组成。离心时,离轴心愈远介质密度愈大。密度梯度离心法又可分为两种操作方法:速率区带离心技术和等比重技术,两者的原理是不同的。

(一) 速率区带技术

用速率区带技术分离样品依赖于样品中粒子或高分子的不同大小和沉降速度。如图

2 所示,把一层样品溶液铺于一密度梯度介质液柱的顶部,样品在液柱顶部形成一负梯度,不过底部存在着一个陡的正梯度,防止了样品的过早沉降。离心力作用下粒子在梯度介质中呈分离的区带状沉降,每一条区带粒子的特征是具有同一沉降速度。根据不同的实验目的可以设计不同的梯度,图 3 是几种常用的梯度形式。

要使速率区带离心得到成功,样品粒子的密度必须大于梯度液柱中任一点的密度,并且必须在区带到达离心管底部以前停止离心。表 1 列举了速率区带法典型实验运转参数。

(二) 等比重技术

等比重技术是按粒子浮力密度分离的方法,为此要选择介质的密度梯度,使梯度的密度范围包括所有待分离粒子的密度。样品可以铺在密度梯度液柱上面或均匀分布于密度梯度介质中。离心过程中粒子移至它本身相同密度的地方形成区带,因此平衡时它们的分离完全是由于它们之间密度的差异,和时间无关(图 4)。

等比重梯度实验中最常用的介质是碱金属的盐溶液,如铯盐或铷盐。实验开始时往往是一密度均一的溶液,在

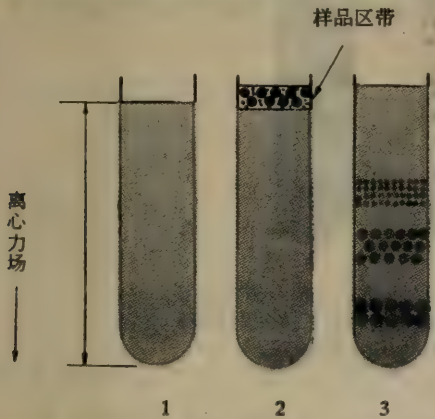


图 2 在水平式转头中进行速率区带分离。1. 充满密度梯度溶液的离心管; 2. 样品加于梯度顶部; 3. 离心力作用下粒子按照它们的质量以不同的速度移动。

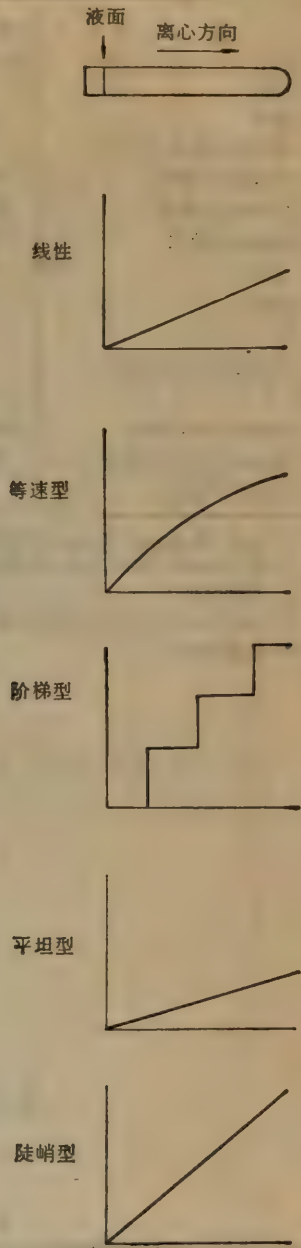


图 3 几种梯度形式

离心过程中自动形成梯度。这个过程称做“自生梯度”。形成梯度过程中,原先均匀分布的样品粒子也下沉或上浮至其等比重位置。这种“自生梯度”技术需要长时间离心,例如 DNA 在氯化铯梯度中形成等比重区带需要 36 到 48 小时。特别要指出是,离心时间不会因转速增加而减少,提高转速只能使梯度物质重新分布,区带位置有所改变。表 2 列举了等比重分离技术的典型实验和运转参数。

许多密度梯度实验常常把速率区带方法和等比重法合并应用。例如选择一个密度梯

表 1 速率区带法的典型实验和运转参数

样 品	沉降系数 (S)	转头 ^{*1}	蔗糖梯度 (%W/W)	转速 (rpm)	时间 ^{*2} (小时)	温度 (°C)
血清	4,7	SW-60	5—20%	60,000	5	5
血清	4,7,19	SW-60	10—40%	60,000	16	5
烟草花叶病毒 (TMV)	180	SW40/41	10—40%	40000	2	5
多核糖体(鼠肝)	80 以上	SW40/41	10—40%	40000	2	5
多核糖体(鼠肝)	80 以上	SW50.1	10—50%	50000	1.5	5
核糖体亚单位	30,50	SW50.1	10—40%	50000	3	5
血清	4,7	SW50.1	5—20%	50000	14	5
血清	4,7	SW50.1	3—15%	50000	6	5
酶(大部分)	2.5—4.5	SW60	10—40%	60000	18	5
亚细胞组分(无线粒体)		SW-27	25/35 ^{*3} 45/55%	27000	3	5
核糖体 RNA (鼠肝)	18,28	SW50.1	5—20%	50000	5	5
核糖体 RNA (鼠肝)	18,28	SW60	10—40%	60000	4.5	5
DNA (大部分)	22	SW60	碱性 10—40%	55,000	5	5

^{*1} 这是 Beckman 离心机的转头型号，它们的含义以 SW50.1 为例，SW 是水平式转头，50 表示最高转速为 50000rpm (50×1000)，最后数字 1 是型号。又如 SW40/41 是二种水平转头，最高转速分别为 40000rpm 和 41000rpm。

^{*2} 如使用不满管不会撕裂的聚碳酸酯，离心管中液体用量少一半，离心时间缩短为全液柱时的 1/2 或 1/4。

^{*3} 不连续梯度。

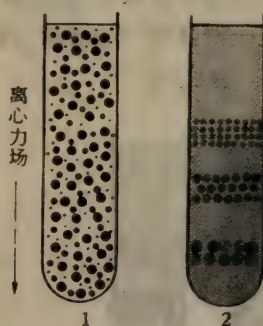


图 4 “自生”梯度等比重分离。1. 样品与梯度物质混合的均匀溶液； 2. 离心力作用下，梯度物质重新分布，样品区带保留在等比重处。

表 2 等比重分离技术的典型实验和运转参数

样 品	样品密度 (g/cm ³)	转头 ^{*1}	离心管材料	起始氯化铯 浓度 (g/cm ³)	转速 (rpm)	时间 (小时)	温度 (°C)
DNA (环状或线型, <i>E. Coli</i>)	1.52 1.57	SW50.1	聚碳酸酯(半满)	1.5	45000	16	20°
DNA (环状或线型, <i>E. Coli</i>)	1.52 1.57	Type50.2	聚碳酸酯(半满)	1.6	45000	16	20°
DNA (噬菌体 <i>spo2</i>)	1.48	Type50.70	聚碳酸酯(半满)	1.5	45000	16	20°
DNA (<i>Micrococcus luteus</i>)	1.70	Type65	聚碳酸酯(半满)	1.6	50000	16	20°

^{*1} SW 水平式转头，Type 角式转头，其余参阅表 1 注。

度使得样品中一部分组分沉降到离心管底部,而另一部分组分停留在它的等比重区。

三、密度梯度分离法的实验方法

(一) 梯度形状

梯度形状对于分离是否成功非常重要,图3中已列举了常用的梯度形状。最常用的是线性密度梯度,分离蛋白质、酶、激素、核糖体亚基和一些植物病毒有良好的分离效果。向下凹的梯度适用于脂蛋白或一些需要上浮分离的样品。不连续或阶梯式梯度最适用于分离整个细胞、植物或动物组织匀浆中的亚细胞组分,以及纯化一些哺乳动物病毒或昆虫病毒。

等速梯度是指这样一种梯度,其中粒子的沉降速度和梯度液柱的长度无关,各区带沉降速度不变,常用的5—20%蔗糖线性梯度就是这样一种梯度。

巨大分子如核糖体亚基、多核糖体以及一些植物病毒,需要一种陡峭的梯度以及长液柱以增进分离能力。

实验操作中常常在离心管底部加一层高密度溶液作为“垫液”,它形成一个阶梯,有时是很有用的。这层垫液的存在使离心后沉降物容易再度悬浮起来,防止有些物质沉降后变化,特别像有些病毒沉积后会失去活性。

(二) 梯度物质

梯度物质的选择原则是满足分离方法的基本要求,除此之外尚应考虑下列几点:

(1) 它的密度范围既能满足所有密度梯度技术分离样品的要求,又不能使转头受过分压力;

(2) 对样品的生物活性有影响;

(3) 对一些敏感组织既不高渗又不低渗;

(4) 不干扰分析技术;

(5) 可以和所需纯化物分开;

(6) 在紫外或可见光区无吸收;

(7) 价格不贵,使用方便;如果价格昂贵必须能回收再用;

(8) 可以灭菌;

(9) 不腐蚀转头;

(10) 不燃,它的气溶胶无毒性。

到现在为止还没有一种完全合乎理想的梯度物质。速率区带法分离时常用蔗糖作梯度物质,等比重法分离最常用的是氯化铯。表3列举了一些普通用作速率区带和等比重梯度物质以及应用它们分离的对象。

(三) 梯度溶液的准备

在制备梯度液柱前必须先配好所需浓度的梯度溶液。如果事先配好储备液就比较方便。Cline 和 Ryel^[42]报道了蔗糖配成66%储备液(室温下将1710克蔗糖加于900ml水中,搅拌至溶),在5℃可无限期放置,很少长菌。图5和图6是这个蔗糖储备液稀释计算

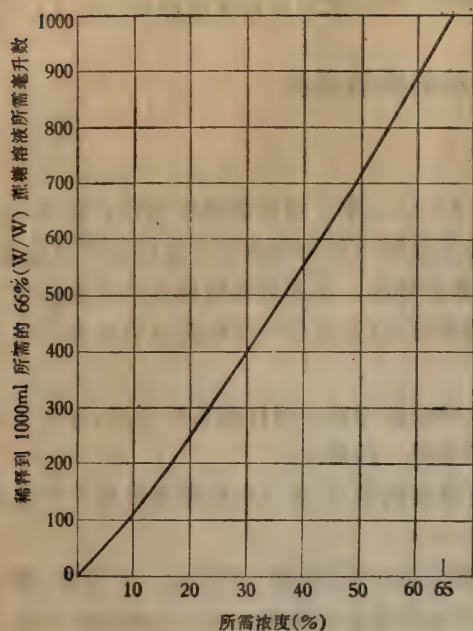


图 5

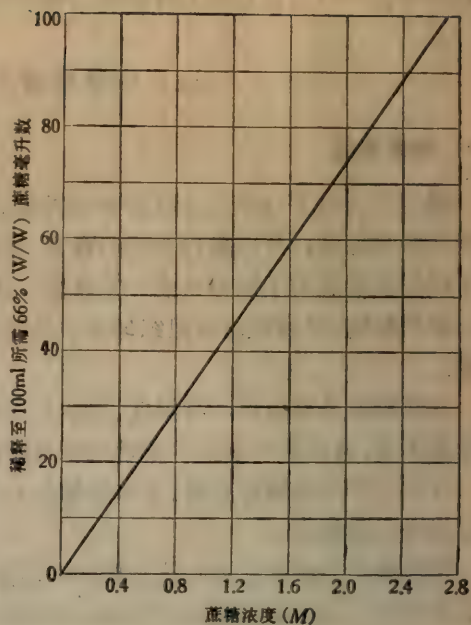


图 6

表 3 梯度物质

密度梯度物质	溶剂	最大密度(20℃)	一般用途
白蛋白	H ₂ O	1.35	细胞分离
氯化铯	H ₂ O	1.91	DNA, 核蛋白, 病毒区带分离
	D ₂ O	1.98	
硫酸铯	H ₂ O	1.26	DNA, RNA 区带分离
硅溶胶	H ₂ O	1.30	细胞分离
右旋糖酐 (M. W.40,000)	H ₂ O	1.13	细胞分离
Ficoll* ¹	H ₂ O	1.17	细胞, 亚细胞颗粒分离
甘油	H ₂ O	1.26	RNA 速率区带法分离
Metrizamide* ²	H ₂ O	1.46	细胞, 亚细胞颗粒分离
溴化钾	H ₂ O	1.37	脂蛋白分级
酒石酸钾	H ₂ O	1.21	病毒区带分离
溴化钠	H ₂ O	1.41	脂蛋白分级
蔗糖(66%)	H ₂ O	1.32	速率区带分离 DNA, RNA, 亚细胞颗粒, 蛋白质
(65%)	D ₂ O	1.37	
碘化钠	H ₂ O	1.80	区带分离 DNA

*¹ 瑞典 pharmacia 出品, 蔗糖聚合物的商业名称。

*² [2-(3-乙酰胺基-5-N-甲基乙酰胺基-2,4,6-三碘苯甲酰胺基-2-脱氧-D-葡萄糖)]。

图。例如需要配制一个密度为 1.176g/cm^3 的蔗糖溶液, 从表 9-2 查到此蔗糖溶液为 40% W/W, 根据图 5 的曲线来配制这个浓度, 可将 550ml 66% 蔗糖储备液稀释至 1000ml。当然也可按比例将 5.5ml 66% 储备液稀释至 10ml。

同理, 从表 9-3 查到密度 1.176g/cm^3 蔗糖溶液的浓度相当于 1.375M, 根据图 6 得到同样结果, 55ml 66% 蔗糖储备液稀释至 100ml。

这里再一次提请特别注意,为了重复文献报道的实验结果,必须搞清楚表示梯度溶液的单位,是 W/W 还是 W/V , 两者是有差别的。例如 $20\%(W/W)$ 蔗糖溶液的密度是 1.081g/cm^3 , 相当于 $21.5\%W/V$ 蔗糖溶液的密度 1.0748g/cm^3 。对氯化铯溶液来讲, 这个差别尤其大。如 $20\%(W/W)$ 氯化铯溶液的密度是 1.758g/cm^3 , 和 $23.4\%W/V$ 氯化铯溶液的密度一样(表 9-4)。

(四) 梯度溶液柱的制备

蔗糖或 Ficoll 等类似的粘性液体的梯度液柱可以用手工或梯度仪制备。
手工制造梯度溶液柱的方法见图 7。在一注射器针上加接一段细管, 其长度要够插入离心管底部。如要在 15ml 离心管中制备 5—20% 蔗糖溶液梯度柱, 先在离心管底部放 3ml 5% 蔗糖溶液, 把管子插入离心管底部, 然后用注射器仔细注入 3ml 10% 蔗糖溶液, 注意避免气泡产生。保持管子尖仍在离心管底, 重复依序注入 3ml 15% 和 3ml 20% 蔗糖溶液, 然后沿管壁小心地拔出针管。此法也适用于制造盐梯度。这种手工制造的梯度是阶梯式梯度, 如要制造光滑的线性梯度则需放置, 任其扩散。粘度愈大, 扩散愈慢, 放置时间愈长。

各种市售或自制的梯度仪均可用来制造梯度, 和手工制造梯度比较可以节省很多时间, 并且容易变换梯度的形式。

实验结果证明, 连续梯度柱柱面浓度和柱底浓度之比以 1:4 为好, 特别是柱面浓度小于 $10\%(W/W)$ 时有较高的分辨率。

氯化铯这类盐溶液用来作等比重密度梯度介质时, 离心过程中会“自生”梯度。因此很容易制作, 只要计算一下盐溶液浓度, 使它在离心力作用下重新分布时能把样品的密度包含在内。梯度的形式, 陡峭还是平坦, 取决于转速和盐溶液的浓度。

“自生”梯度的完成需要很长时间离心。事先用上述手工铺层方法制作, 可以缩短离心时间, 或者像沉降平衡分析一样(第 49 页)把梯度液柱缩短。不过这样做的话, 样品的浓度或体积也要相应减少, 并且要选用那些允许液体只装部分而不要装满的那种离心管, 如聚碳酸酯离心管。否则的话, 必须将离心管上部空隙用低密度液体, 如矿物油之类与密度梯度溶液不互溶的液体充满, 以免离心过程中离心管碎裂。

表 4 是一些铯盐和铷盐的浓度和密度换算表。至于氯化铯溶液在 25°C 时的密度、折射率和浓度的数据列在表 9-2 中。

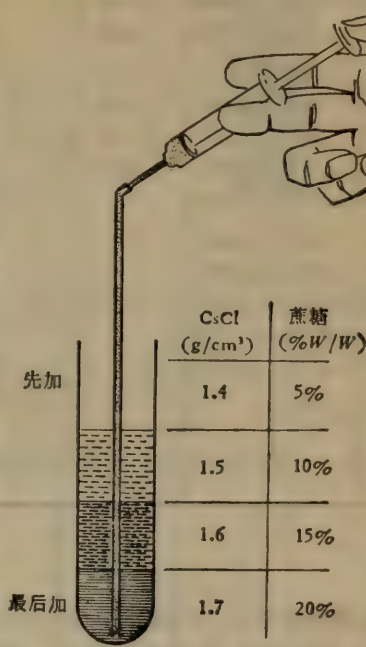


图 7

表 4 一些钾盐和铷盐的浓度和密度换算表 (20℃)

%W/W	CsCl	CsBr	CsI	Cs ₂ SO ₄	CsNO ₃	RbCl	RbBr	RbI	Rb ₂ SO ₄	RbNO ₃
1	1.00593	1.00612	1.00608	1.0061	1.00566	1.00561	1.00593	1.00591	1.0066	1.0053
2	1.01374	1.01412	1.01402	1.0144	1.01319	1.01307	1.01372	1.01370	1.0150	1.0125
4	1.02969	1.03048	1.03029	1.0316	1.02859	1.02825	1.02965	1.02963	1.0322	1.0272
6	1.04609	1.04734	1.04707	1.0494	1.04443	1.04379	1.04604	1.04604	1.0499	1.0422
8	1.06297	1.06472	1.06438	1.0676	1.06072	1.05917	1.06291	1.06296	1.0680	1.0575
10	1.08036	1.08265	1.08225	1.0870	1.07745	1.07604	1.08028	1.08041	1.0864	1.0731
12	1.09828	1.10116	1.10071	1.1071	1.09463	1.09281	1.09817	1.09842	1.1052	1.0892
14	1.11676	1.12029	1.11979	1.1275	1.11227	1.11004	1.11661	1.11701	1.1246	1.1057
16	1.13582	1.14007	1.13953	1.1484		1.12775	1.13563	1.13621	1.1446	1.1227
18	1.15549	1.16053	1.15996	1.1696		1.14596	1.15526	1.15605	1.1652	1.1401
20	1.17580	1.18107	1.18112	1.1913		1.16469	1.17554	1.17657	1.1864	1.1580
22	1.19679	1.20302	1.20305	1.2137		1.18396	1.19650	1.19781	1.2083	1.1763
24	1.21849	1.22634	1.22580	1.2375		1.20379	1.21817	1.21980	1.2309	1.1952
26	1.24093	1.24990	1.24942	1.2643		1.22421	1.24059	1.24257	1.2542	1.2146
28	1.26414	1.27435	1.27395			1.24524	1.26380	1.26616	1.2782	1.2346
30	1.28817	1.29973	1.29944			1.26691	1.28784	1.29061	1.3028	1.2552
35	1.35218	1.36764	1.36776			1.32407	1.35191	1.35598	1.3281	1.2764
40	1.42245	1.44275	1.44354			1.38599	1.42233	1.42806		
45	1.49993	1.52626	1.52803			1.45330	1.50010	1.50792		
50	1.58575	1.61970	1.62278			1.52675	1.58639	1.59691		
55	1.68137	1.72492					1.68254	1.69667		
60	1.78859							1.80924		
65	1.90966							1.93722		

(五) 加样方法

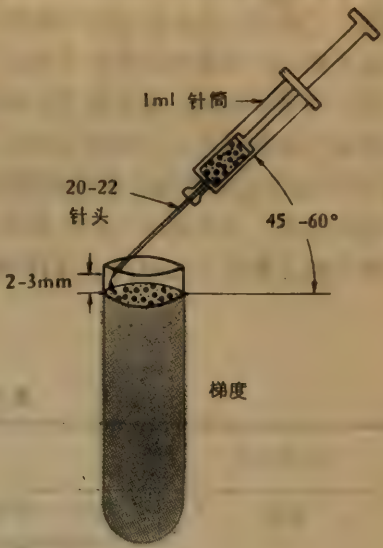
究竟在一密度梯度液柱上可加多少样品,样品的浓度多大,这都需要先行测定。如果样品浓度过大,会产生液流,并且有可能产生沉淀。即使不产生沉淀,过分高的样品浓度也会使分离区带变宽而丧失分辨率。如果样品浓度太低,那末分离区带难于鉴定。实验证明选用水平式转头,离心管内密度梯度液柱可承担样品的最大浓度,为该密度梯度液柱最小密度的浓度的 1/10(W/W),例如 6—20% 梯度液柱可支持样品的浓度为 0.6% (W/W)。

表 5 Beckman 制备离心机水平转头一般上样量

转 头	样品容量 (ml/管)	离心管直径	
		(in)	(cm)
SW65, 50.1, 50, 39	0.2	1/2	1.27(1.3)
SW60	0.2	7/16	1.11(1.1)
SW40, 41	0.5	9/16	1.42(1.4)
SW27.1	0.5	5/8	1.58(1.6)
SW36	0.5	5/8	1.58(1.6)
SW27, 25.1, 25.2	1—2	1	2.54(2.5)

样品加入的量就水平式离心转头来讲是离心管截面积的函数。上样品过多，区带变厚，多组分体系不能有效地分离。表 5 是 Beckman 制备超速离心机的一些转头所用离心管常规的上样量，其他规格离心管可参考之。

样品铺到梯度液柱上去可按图 8 的方法。针尖和离心管成 $45-60^\circ$ 角，慢慢地将样品沿管壁铺到液面上去。像 DNA 这类容易断开的脆弱样品，应该用孔径较大的移液管代替针头以减弱剪力的作用。



(六) 分离区带的回收

有许多商品生产的回收区带仪器，用手工方法回收也很方便。离心完毕后，可用注射器或滴管小心地按层次从离心管上部移出。也可在离心管底部打孔，分步收集流出液，不过要控制流速，不要引起扰动。如果样品区带是有颜色的或者可以用方法在离心管内检测，则可将注射针直接穿透离心管样品区带部分的管壁，把样品抽出。

四、实验设计的一些参考

(1) 表 6 列举了用超离心机分离生物物质的一些典型分离步骤，供设计实验参考。

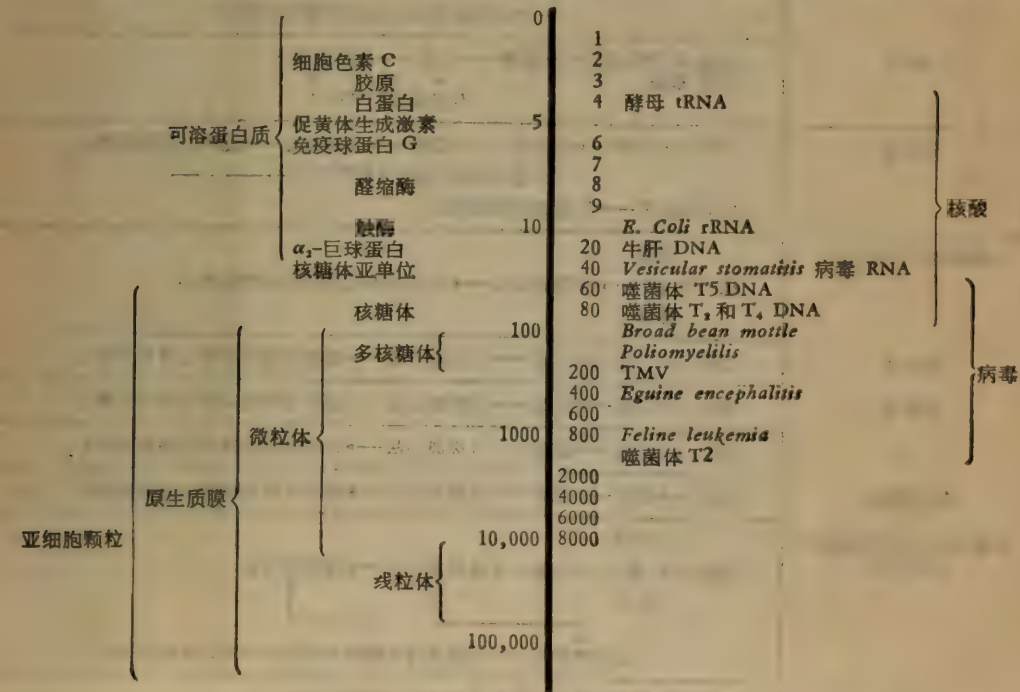


图 9

(2) K 因子和 K' 因子: 离心分离究竟要旋转多长时间? 这是经常会遇到的一个问题。工作者往往按照文献中报道的离心时间, 或者就任意决定一个离心时间。但是这样选的离心时间通常长于粒子分离真正需要的时间, 特别是目前用了高速转头更是如此。这样既浪费了时间, 也多耗用了超离心机, 相对来讲缩短了仪器使用寿命。因此要正确选择和高效利用转头, 用得上 K 因子和 K' 因子。 K 因子是用来决定已知沉降系数 s (单位 S) 的粒子沉降到离心管底所需的时间, 而 K' 因子是用来决定已知 s 值(单位 S) 的某一样品区带, 从蔗糖 5—20% 密度梯度柱(这是一种用得最多的密度梯度液柱)顶部离心沉降到离心管底部的时间。它们和离心时间分别有下列关系:

$$t = \frac{K}{S_{20, w}} \quad (1)$$

表 6 离心分离的典型分离步骤

待分离物质	分离步骤
细胞	组织 → 分散细胞 → 速率区带法或等比重离心法 细胞组织培养液 → 速率区带法 或 → 或 红血球 → 等比重离心法
脂蛋白	血清 → 分级离心法 或 → 等比重离心法 蛋白质 → 速率区带法
核酸 DNA	细胞, 亚细胞级分, 病毒, 细菌 → 溶解 → 抽提 → 速率区带法或等比重离心法 → 与去污剂研磨 → 等比重氯化铯离心 → 碱性蔗糖溶解以后用速率区带法
RNA	细胞, 亚细胞级分, 病毒, 细菌 → 溶解 → 抽提 → 区带速率法 ↓ 沉淀通过 CsCl → 区带速率法
蛋白质	细胞 → 匀浆 → 分级离心 → 溶解 → 分级离心 → 速率区带梯度离心 → 盐沉淀和/或柱层析 血清或血浆 → 区带速率梯度离心
亚细胞颗粒染色质	匀浆 核 → 或 → 分级离心法 → 区带速率法或等比重梯度离心 抽提
微粒体	组织 → 匀浆 → 过滤 → 分级离心法 → 速率区带法或等比重梯度离心
线粒体	组织 → 匀浆 → 过滤 → 分级离心法 → 速率区带法或等比重梯度离心
核	组织 → 匀浆 → 过滤 → 分级离心法 → 速率区带法或等比重梯度离心
原生质膜	组织 → 匀浆 → 过滤 → 分级离心法 → 速率区带法或等比重梯度离心
核糖核蛋白体和多核糖核蛋白体	匀浆 组织 → 或 → 过滤 → 分级离心法 → 速率区带法 溶解 ↓ 去污剂处理 → 沉淀通过蔗糖阶梯梯度 → 等比重梯度离心
病毒	细胞 → 匀浆 → 分级离心法 → 等比重梯度离心

和

$$t' = \frac{K'}{S_{20, w}} \quad (2)$$

不同的转头具有不同的 K (或 K') 值, 商品生产的制备超离心机转头一般都提供 K (和 K') 的数值。显然 K 和 K' 值越小, 转头效率越高, 离心时间越短。用式 (1) 和式 (2) 计算离心时间需要知道样品的沉降系数 S , 一般生物物质的沉降系数的大致范围见图 9。

收到期

84.3.19.

来源

西单新

书价

¥1.00

单据号

0385474

开票日期

84.3.19.

中科院植物所图书馆



S0011848

参 考 文 献

- [1] Svedberg, T. & H. Rinde: *J. Amer. Chem. Soc.*, **46**, 2677—2693 (1924).
- [2] Svedberg, T. & R. Fåhrus: *J. Amer. Chem. Soc.*, **48**, 430—438 (1926).
- [3] Svedberg, T. & K. O. Pederson: *The Ultracentrifuge*, 1—478 Oxford University Press (1940).
- [4] Schachman, H. K.: *Ultracentrifugation in Biochemistry*. Academic Press, New York (1959).
- [5] Fujita, H.: *Mathematical Theory of Sedimentation Analysis*. Academic Press, New York (1962).
- [6] Philpot, J. St. L.: *Nature*, **141**, 283 (1938).
- [7] Svensson, H.: *Kolloid-Z.*, **87**, 181 (1939).
- [8] Svensson, H.: *Kolloid-Z.*, **90**, 141 (1940).
- [9] Casassa, E. F. & H. Eisenberg: *Adv. Pro. Chem.*, **19**, 287 (1964).
- [10] Labar, F. E. & R. L. Baldwin: *J. Phys. Chem.*, **66**, 1952 (1962).
- [11] Johnston, J. P. & A. G. Ogston: *Trans. Faraday Soc.*, **42**, 789 (1946).
- [12] Harrington, W. F. & H. K. Schachman: *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 3533 (1953).
- [13] Trautman, R., V. N. Schumaker, W. F. Harrington & H. K. Schachman: *J. Chem. Phys.*, **22**, 555 (1954).
- [14] Baldwin, R. L.: *Biochem. J.*, **55**, 644—648 (1953).
- [15] Rosenbloom, J. & V. N. Schumaker: *Biochem.*, **6**, 76 (1967).
- [16] Kirschner, M. W. & H. K. Schachman: *Biochem.*, **10**, 1900 (1971).
- [17] Gilbert, G. A.: *Proc. Roy. Soc.*, **A250**, 377 (1959).
- [18] Gilbert, G. A. & R. C. Ll. Jenkins: *Proc. Roy. Soc.*, **A253**, 1420 (1959).
- [19] Josephs, R. & W. F. Harrington: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **58**, 1587 (1967).
- [20] Vinograd, J. R. Bruner, R. Kent & J. Weigh: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **49**, 902 (1963).
- [21] Studier, F. W.: *J. Mol. Biol.*, **11**, 373 (1965).
- [22] Bottger, M., D. Bierworf, V. Wurderlich & A. Graffi: *Biochim. Biophys. Acta.*, **232**, 21 (1971).
- [23] Teller, D. C.: *Method in Enzymology*, **27**. (ed. by C. H. W. Hirs, S. N. Timasheff), Academic Press, New York, p. 346 (1973).
- [24] Creeth, J. M. & R. H. Pain: *Progr. Biophys. Mol. Biols.*, **17**, 217 (1967).
- [25] Richards, E. G., D. C. Teller & H. K. Schachman: *Biochem.*, **7**, 1054 (1968).
- [26] Hexner, P. E., L. E. Radford & J. W. Beams: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **47**, 1848 (1961).
- [27] Pasternak, R. A., G. M. Nazarian & J. R. Vinograd: *Nature*, Lond., **179**, 92—94 (1957).
- [28] Griffith, O. M.: *Anal. Biochem.*, **19**, 243 (1967).
- [29] Richards, E. G. & H. K. Schachman: *J. Phys. Chem.*, **63**, 1578 (1959).
- [30] Lamm, O.: *Z. Physik. Chem.*, (Leipzig) **A143**, 177 (1929).
- [31] Nazarian, G. M.: *Anal. Chem.*, **40**, 1766 (1968).
- [32] Yphantis, D. A.: *Biochem.*, **3**, 297 (1964).
- [33] Van Holde, K. E. & R. L. Baldwin: *J. Phys. Chem.*, **62**, 734 (1958).
- [34] Kawahara, K. & T. Tanford: *J. Biol. Chem.*, **241**, 3228 (1966).
- [35] Emerson, M. F. & A. Holtzer: *J. Phys. Chem.*, **71**, 1898 (1967).
- [36] Archibald, W. J.: *J. Phys. Colloid Chem.*, **51**, 1204 (1947).
- [37] Ifft, J. B., D. H. Voet & J. Binograd: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **47**, 1015 (1961).
- [38] McMeekin, T. L. & K. Marshall: *Science*, **116**, 142 (1952).
- [39] Cohn, E. J. & J. E. Edsall: *Proteins, Amino Acids and Peptides*. Reinhold, 1943.
- [40] Edelstein, S. J. & H. K. Schachman: *Methods in Enzymology* **27**, (ed. by C. H. W. Hirs & A. M. Timasheff), Academic Press, New York, 83 (1973).
- [41] Thomas, J. O. & S. J. Edelstein: *Biochem.*, **10**, 477 (1971).
- [42] Cline, G. B. & R. B. Ryel: *Methods in Enzymology* **22**. (ed. by S. P. Colowick & K. O. Kaplan), Academic Press, New York, 168 (1971).

23491

58.173057

474

1984/7 84.4.16
果立 1985.10.15 续 11.18.
徐志平 1985.12.26
解雪梅 86.3.26

徐志平 86.12.26
徐志平 1988.2.27 续 3.20

徐志平 87.4.24 续 7.1.

徐志平 87.9.11.

注 意

58.173057

- 1 借书到期请即送还。
- 2 请勿在书上批改圈点，23491折角。
- 3 借去图书如有污损遗失等情形须照章赔偿。

京卡0701

统一书号: 13031·2394

定 价: 1.00 元

本社书号: 3272·13-1

科技新书目: 57-30

58,
474